

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับของสารสื่อประสาทชนิดปกป้องใน
ทางเดินอาหารและในพลาสมาเพื่อใช้บ่งชี้การสูญเสียหน้าที่ของระบบ
ป้องกันของทางเดินอาหารในสัตว์ที่มีความเครียด

โดย

สุทธาสินี ปุณฺณโชติ

ฉัตรศรี เดชะปัญญา

กรกฎาคม 2556



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับของสารสื่อประสาทชนิดปกป้องในทางเดินอาหาร และใน
พลาสมาเพื่อใช้บ่งชี้การสูญเสียหน้าที่ของระบบป้องกันของทางเดินอาหารในสัตว์ที่มีความเครียด

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะสัตวแพทยศาสตร์

ประจำปี 2554

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

รศ.สพญ.ดร.สุทธาสินี ปุญญโชติ

รศ.ดร.ฉัตรศรี เตชะปัญญา

กรกฎาคม 2556

Project Title Analysis of the intestinal and plasma neurotransmitter level that has the mucoprotective and repairing effects to indicate the abnormalities of intestinal defense mechanism in stress animals

Name of the Investigator.....Associate Professor Sutthasinee Poonyachoti.....

Duration.....October 1, 2010 to September 30, 2011.....

Abstracts

This study was aimed to examine stress duration affected on calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP) level and function on secretory-motor neural reflex, the major mucosal host defense. Three groups of male Wistar rat (5 rats per group) were exposed to psychological stress by immobilizing in rodent restrainer for 1 hour for 3, 7 or 14 consecutive days (3d, 7d or 14d group, respectively). Some animals (control) were kept unstressed. At the end of experiment, all rats were anesthetized and plasma collection was performed via cardiac puncture. Distal colon was isolated for measurement of CGRP and SP level using enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Distal colonic mucosa was additionally stripped for measurement of ion transport using Ussing chamber-voltage clamp technique. Mucosal secretory-motor reflex ability was tested by stimulating with capsaicin (CAP, 3 μ M) to produce short-circuit current changes (Isc). Intact mucosal integrity was evaluated by its response to CGRP (10 μ M) or SP (1 μ M) treatment. The results show that all stress colonic mucosa had lower Isc than those of control rats suggesting the decrease of mucosal secretory function affected by stress. CAP-stimulated Isc in all stress rats were lower than control (70-90%). CGRP- or SP-induced Isc in stress rats was similar to control suggesting the unchanged mucosal integrity. However, increased CGRP-response was founded in chronic stress (14d). CGRP level but not SP level of colonic tissue were decreased (>90%) in correlation with CAP-induced Isc response ($r=0.7946$) in all stress rat. Plasma CGRP were increased in 3d or 7d-stress rat but not related to CAP-responses. In addition, increased plasma SP was significantly founded in 14d which their colon has lowest response to CAP. Therefore, stress altered function of secretory-motor defense mechanism by decreasing of colonic CGRP. Loss of mucosal secretory-motor reflex may be predicted by high plasma SP level.

ชื่อโครงการวิจัย การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับของสารสื่อประสาทชนิดปกป้องในทางเดิน
อาหาร และในพลาสมาเพื่อใช้บ่งชี้การสูญเสียหน้าที่ของระบบป้องกันของ
ทางเดินอาหารในสัตว์ที่มีความเครียด

ชื่อผู้วิจัย.....รศ.สพญ.ดร.สุทธาสินี ปุญญโชติ.....

ระยะเวลาการดำเนินการวิจัย.....1 ตุลาคม 2553 ถึง 30 กันยายน 2554.....

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงผลของความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับความเข้มข้น สารสื่อประสาทชนิดแคลซิโทนินยีนรีเลทเปปไทด์ (CGRP) และซัสแตนท์ พี (SP) ซึ่งเป็นสารเปปไทด์จากระบบประสาทรีเฟล็กซ์รับความรู้สึก ว่ามีความสัมพันธ์ต่อการเปลี่ยนแปลงการขับหลังของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ซึ่งเป็นระบบปกป้องของเยื่อบุทางเดินอาหารเมื่อได้รับความเครียดที่ระยะเวลาต่างๆกัน โดยการเหนี่ยวนำให้หนูขาวเพศผู้พันธุ์สต้อมากักขังไว้ในที่จับสัตว์ทดลองเพื่อให้เกิดความเครียดทางจิตใจวันละ 1 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาสั้น (3 วัน) กึ่งเรื้อรัง (7 วัน) และเรื้อรัง (14วัน) กลุ่มละ 5 ตัว โดยมีกลุ่มควบคุม 3 กลุ่มที่ไม่ถูกกักขัง เมื่อครบเวลาทำการสลบสัตว์ทดลอง ทำการเจาะเก็บพลาสมาจากหัวใจ และแยกเก็บเนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ส่วนปลายเพื่อนำมาวัดระดับของ CGRP และ SP ด้วยวิธีอิลูซา นำลำไส้ใหญ่ส่วนปลายที่เหลือนำมาวัดการขับหลังด้วยการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้า (Isc) ที่ตอบสนองต่อสารกระตุ้นจากแคปไซซิน (CAP) หรือจากสารสื่อประสาท CGRP และ SP ด้วยอุปกรณ์ Ussing chamber-voltage clamp พบว่าเยื่อบุลำไส้ใหญ่จากหนูเครียดทุกกลุ่ม มีค่า Isc ในภาวะพักน้อยกว่ากลุ่มควบคุม 40% ($P < 0.05$) บ่งชี้ให้เห็นถึงการลดลงของการขับหลังสารประจุลบ เช่น คลอไรด์ และพบว่าการเพิ่มหรือการลดลงของ Isc ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย CAP ที่พื้นฐานของเยื่อบุจากหนูที่ได้รับ ความเครียดทุกกลุ่มลดลง 70-90% ตามลำดับ แต่การเพิ่ม Isc ต่อ CGRP หรือ SP ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม CGRP เพิ่มค่า Isc ของลำไส้จากหนูกลุ่ม 14 d อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าลำไส้ใหญ่ของหนูที่ได้รับ ความเครียดมีระดับ CGRP ลดลงมากกว่า 90% โดยสอดคล้องกับการตอบสนองต่อ CAP ที่ลดลง ($r = 0.7946$) โดยไม่พบการลดลงของ SP ในลำไส้ใหญ่ อย่างไรก็ตามกลับพบว่าระดับของ CGRP และ SP เพิ่มขึ้นในพลาสมาของหนูที่ได้รับ ความเครียด 3 7 และ 14 วันตามลำดับ โดยการเพิ่มของพลาสมา SP สัมพันธ์กับการสูญเสียการทำหน้าที่ของรีเฟล็กซ์ขับหลัง ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความเครียดแม้ว่าจะเป็นเพียงระยะสั้นจะทำให้เกิดการสูญเสียการทำหน้าที่ของระบบประสาทรับความรู้สึกเนื่องจากผลในการลดลงของ CGRP ในลำไส้ใหญ่ และการสูญเสียการทำงานดังกล่าวสามารถพยากรณ์ได้จากการตรวจพบของการเพิ่มขึ้นของระดับ SP ในพลาสมา

บทนำ

กลไกของระบบป้องกันของทางเดินอาหารประกอบด้วย 2 ระบบ คือ ระบบปกป้องของทางเดินอาหาร (intestinal epithelial barrier defense mechanism) เป็นระบบเบื้องต้นที่ร่างกายมีอยู่แล้ว เช่น เอ็นไซม์ การยอมให้สารผ่านเข้าออกของเยื่อบุทางเดินอาหาร (intestinal permeability) จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารบางชนิด การเรียงตัวกันของเยื่อบุทางเดินอาหารด้วย tight junction และการหลั่งสารภูมิต้านทานต่างๆ ระบบนี้จะตอบสนองอย่างรวดเร็ว ไม่เฉพาะเจาะจง (nonspecific defense mechanisms) และป้องกันให้เกิดการเสียหายของเนื้อเยื่อน้อยที่สุด (Perdue and Mackay, 1994)

การควบคุมกลไกทำงานของระบบปกป้องของเยื่อเมือกจะอยู่ภายใต้การควบคุมด้วยระบบประสาทที่อยู่ในทางเดินอาหาร (Enteric Nervous System, ENS) การทำงานร่วมกันของ ENS เซลล์ของระบบภูมิต้านทานและระบบทำงานที่เป็นเป้าหมาย (effector system) เช่น กล้ามเนื้อเยื่อ และเซลล์ที่มีเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหว (motility) การขับหลั่ง (secretion) และการซ่อมแซมจากการรุกรานของสิ่งแปลกปลอม หรือจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสื่อประสาทที่หลั่งมาจาก IPANs เช่น Calcitonin Gene Related-Peptides (CGRP) หรือ Substance P (SP) ยังมีบทบาทในการเชื่อมโยงสัญญาณ เช่น การเจ็บปวด จากสิ่งกระตุ้นผ่านไขสันหลังไปยังระบบประสาทส่วนกลางเพื่อให้เกิดกระบวนการป้องกันที่ระบบทางเดินอาหารสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ระบบประสาทรับความรู้สึกเบื้องต้น (IPANs) ที่พบในทางเดินอาหารจะหลั่งสารสื่อประสาทสำคัญ 2 ชนิดคือ substance P และ CGRP ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญในการเพิ่มการหลั่งของสารน้ำและอิเล็กโทรไลต์ และเพิ่มการขยายตัวของหลอดเลือด (Fumess et al., 1999) ดังนั้นจึงมีบทบาทสำคัญอย่างมากในกระบวนการป้องกันการทำลายของระบบเนื้อเยื่อและเยื่อบุวิวะ (mucosal protective functions) ในภาวะที่เกิดมีการอักเสบเกิดขึ้น การทำลายระบบประสาทรับความรู้สึก (denervation) นี้ด้วยการตัดออก หรือใช้สาร capsaicin ทำให้เกิดสูญเสียของ neurochemical substances โดยเฉพาะ CGRP ที่หลั่งมาจากปลายประสาทนี้ทำให้การอักเสบของลำไส้ใหญ่ทั้งชนิด acute และ subacute Triinitrobenzenesulfonic acid (TNB)-induced colitis มีความรุนแรงมากขึ้น (Reinshagen et al., 1996) ทั้ง CGRP และ SP ยังมีบทบาทเป็น proinflammatory mediators โดยทำให้เกิดการแตกตัวของ mast cells หรือยังกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสาร proinflammatory cytokines อื่นๆ จาก lymphocytes ที่อยู่บริเวณรอบๆ ปลายประสาทด้วยและทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นจำนวน (proliferation) ของ T helper cells (Th2) ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของ IgA-committed B cells (Ottaway, 1991) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า substance P เป็นสาเหตุที่ทำให้การอักเสบแบบ neurogenic inflammation ที่เกิดขึ้นอยู่แล้วทั้ง colitis และ enteritis มีความรุนแรงมากขึ้นแต่สามารถป้องกันได้ด้วยสารยับยั้งตัวรับของ substance P หรือการทำ sensory denervation (Stucchi et al., 2003)

และในรายงานการศึกษาล่าสุดพบว่า การซ่อมแซมเยื่อบุทางเดินอาหารในหลอดทดลองโดยการใช้การศึกษาด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง IEC-18 สามารถเกิดขึ้นได้ดีเมื่อได้รับสารที่หลั่งออกมาจาก mast cell ที่กระตุ้นด้วยสารสื่อประสาท CGRP ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ CGRP ต่อกระบวนการซ่อมแซมเยื่อบุทางเดินอาหาร (Bulut et al., 2008)

การตอบสนองของความเครียดของร่างกาย มีกลไกผ่านระบบ hypothalamic-pituitary-adrenal gland axis (HPA) ทำให้เกิดการหลั่ง cortisol ตามมาซึ่งจะไปมีผลต่อระบบต่างๆของร่างกาย ดังนั้นจึงมีการใช้ค่า cortisol เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดความเครียดในสัตว์ แต่อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของค่า cortisol นั้นมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นได้แม้ว่าสัตว์จะไม่ได้ได้รับความเครียด เช่น ในขณะที่สัตว์มีการเจริญเติบโต หรือการเปลี่ยนแปลงตามปกติระหว่างวัน เป็นต้น ในทางตรงกันข้าม สารสื่อประสาทที่มีบทบาทในการซ่อมแซมหรือมีบทบาทในกระบวนการปกป้องร่างกาย มีการตอบสนองและสามารถเปลี่ยนแปลงได้ในสภาวะร่างกายอยู่ในสภาวะไม่สมดุล เช่น ในสภาวะเครียด และในสภาวะที่มีความเสียหายเกิดขึ้นเนื่องจากระบบประสาทเหล่านี้เป็นระบบที่ทำหน้าที่ติดต่อและส่งสัญญาณไปยังระบบอื่นที่เกี่ยวข้องด้วย และอาจเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของระบบปกป้องของเยื่อบุทางเดินอาหารที่เกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้รับความเครียดมีความสัมพันธ์สอดคล้องกับระดับความรุนแรงกับการสูญเสียหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกันของทางเดินอาหารด้วย

ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่ระบบปกป้องของทางเดินอาหารตอบสนองทันทีต่อสารกระตุ้น capsaicin ต่อการขับหลังอิเลคโตรไลต์ของเยื่อลำไส้ใหญ่ว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรบ้างที่ระยะต่างๆกัน คือที่ระยะสั้น ระยะกึ่งเรื้อรัง และระยะเรื้อรังโดยใช้แบบการทดลองเหนี่ยวนำให้สัตว์เกิดความเครียดจากจิตใจโดยใช้วิธีการกักขัง (immobilization) ในหนูขาวเป็นแบบการศึกษา และการสูญเสียการปกป้องดังกล่าวมีความสัมพันธ์อย่างไรต่อระดับของสารสื่อประสาทในพลาสมา ในเนื้อเยื่อทางเดินอาหาร กับการทำหน้าที่ของระบบประสาทชนิด IPANs ที่สำคัญคือ CGRP และ substance P ที่มาควบคุมการขับหลังที่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น ด้วยอุปกรณ์ Ussing chamber-voltage clamp และวิธี Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) ผลการศึกษาที่ได้จะนำมาใช้เป็นแนวทางในการประเมินสภาวะของสัตว์ ช่วยในการพยากรณ์และแก้ไขไม่ให้สัตว์เกิดความผิดปกติของระบบปกป้องของทางเดินอาหารโดยเฉพาะในขณะที่สัตว์เกิดความเครียด และระบบประสาทที่ได้กล่าวมาอาจเป็นเป้าหมายที่สำคัญในกระบวนการของโรคต่างๆที่เกิดจากความเครียดได้

ขั้นตอนและวิธีการวิจัย

วัสดุ และสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในระบบ Ussing system และ ELISA: NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, NaHCO₃, NaH₂PO₄, Glucose, Mannitol จากบริษัท Fisher Scientific Inc., Fairtawn, NJ, USA สารกระตุ้น

ริเฟล็กซ์ สารสื่อประสาท: 8-methyl-vanillyl-6-nonenamide (Capsaicin; CAP), calcitonin gene related-peptides (CGRP) และ substance P (SP) และสารสำหรับสกัดเปปไทด์ NP-40 และ protease inhibitor cocktail จาก Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA., ยาสำหรับสลบสัตว์ Pentobarbital sodium (Nembutal[®], CEVA Sante Animale, Brussel, Belgium) ชุดตรวจ ELISAVEIA สำหรับ Rat corticosterone จาก IDS[®] Immunodiagnostics, AZ, USA และ ชุดตรวจ ELISA สำหรับ Rat Calcitonin gene-related peptides (Cat No. EK-015-09) และ Rat Substance P (Cat No. EK-015-09) Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA)

การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักตัว 180-200 กรัม จำนวน 30 ตัว จากศูนย์ สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม เลี้ยงในห้องควบคุม อุณหภูมิที่ 25°C ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในแต่ละวันให้อาหารสำเร็จรูปและน้ำอย่างเพียงพอ ควบคุมปริมาณแสงสว่างโดยให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และปิดไฟอีก 12 ชั่วโมง ตลอดจนเปลี่ยนวัสดุรองนอนทุกวันเว้นวันเพื่อให้สัตว์ทดลองได้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม (acclimatization) ก่อนทำการทดลองเป็นระยะเวลา 5-7 วัน โดยทุกขั้นตอนการใช้และการเลี้ยงดูสัตว์ทดลองได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการควบคุมการเลี้ยงและการใช้สัตว์ เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

หนูถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียด 15 ตัว
- กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ทำให้เกิดภาวะเครียดโดยการกักขังระยะสั้น 3 วัน 5 ตัว
- กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ทำให้เกิดภาวะเครียดโดยการกักขังระยะกึ่งเรื้อรัง 7 วัน 5 ตัว
- กลุ่มที่ 4 กลุ่มที่ทำให้เกิดภาวะเครียดโดยการกักขังระยะเรื้อรัง 14 วัน 5 ตัว

วิธีการทำให้หนูทดลองเกิดความเครียด

ทำการทดลองให้เกิดความเครียดจากจิตใจด้วยวิธีกักขังแบบระยะสั้น (acute immobilization stress) ระยะกึ่งเรื้อรัง (sub-chronic immobilization stress) หรือระยะเรื้อรัง (chronic immobilization stress) โดยการบังคับหนูขาวให้อยู่ในอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับบังคับสัตว์ที่ถูกต้องตามหลักจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง (rodent restrainer) ทำด้วยพลาสติกที่มีขนาดพอดีกับตัวสัตว์และมีรูเปิดบริเวณจมูกเพื่อให้สัตว์หายใจได้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ระหว่างเวลา 10.00-11.00 น.) ทุกวันเป็นเวลาติดต่อกัน 3 วัน 7 วัน หรือ 14 วันตามลำดับ โดยที่หนูบางตัวที่ใช้เป็น

กลุ่มควบคุมจะเลี้ยงในชั่งเวลาเดียวกัน แต่จะสุมมาทำการรูดขนาดเพื่อศึกษาการขนส่งอิเล็กโทรไลต์ ในช่วงเวลาเดียวกับหนูที่ได้รับความเครียด

การเก็บตัวอย่างลำไส้ใหญ่ และพลาสมา

หลังจากสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บเนื้อเยื่อลำไส้จากสัตว์ทดลองทุกตัวโดยทำการเหนี่ยวนำสัตว์ให้สลบด้วยการฉีด Pentobarbital sodium (Nembutal[®]) ความเข้มข้น 80 mg/kg นำหนักรัดตัว เข้าทางช่องท้อง เมื่อสัตว์ทดลองสลบแล้วใช้มีดผ่าตัดเปิดผ่าแนวกลางลำตัวจากช่องท้อง ใช้กรรไกรตัดเก็บลำไส้ใหญ่ส่วนปลายซึ่งจะมีความยาวประมาณ 10-15 cm. นำลำไส้ที่ได้ บ่มไว้ในสารละลาย Ringer's solution ซึ่งมีส่วนประกอบและความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์เท่ากับ extracellular fluid (118 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 0.54 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄, pH 7.4) ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยให้ก๊าซ carbogen (95% O₂ และ 5% CO₂) ไร้ออกซิเจนจนกว่าจะดำเนินการทดลอง (ภายในเวลาไม่เกิน 10 นาที) จากนั้นทำการเปิดช่องอกเพื่อเจาะเลือดจากหัวใจโดยใช้เข็มฉีดยา (needle) เบอร์ 21 และหลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 5 ml. ใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA บั่นแยกเพื่อเก็บพลาสมาแล้วเก็บไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้ จากนั้นเปิดผ่าช่องท้องเพื่อทำการเก็บลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ทำการการรูดขนาดสัตว์ทดลอง เจาะหลอดเลือดออกจากหัวใจให้ได้ปริมาณมากที่สุดเพื่อให้สัตว์ตายอย่างไม่ทราบด้วยภาวะ hypovolemic shock

พลาสมาตัวอย่างจากหนูทดลองทุกตัวการวัดระดับของ corticosterone โดยวิธี EIA โดยการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อบ่งชี้สัตว์ทดลองว่ามีความเครียด ผลการทดลองจากหนูทดลองที่มีระดับ corticosterone ที่สูงกว่าค่าปกติเท่านั้นจะถือว่าเป็นผลการทดลองที่เกิดจากความเครียด

การเตรียมเนื้อเยื่อจากลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูขาว

นำลำไส้วางบนกระดาษแล้วทำการตัดเปิดลำไส้จากด้าน mesentery ตลอดความยาว ทำความสะอาดเนื้อเยื่อด้วยสารละลาย Ringer's solution ใช้ปากคีบลอกชั้นกล้ามเนื้อของลำไส้เล็ก โดยเริ่มจากลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon) ที่อยู่ติดกับส่วน rectum แบ่งให้มีมีความยาวชิ้นละ 1.5 mm. แล้วนำมาติดตั้งกับอุปกรณ์ติดตั้งเนื้อเยื่อ (tissue chamber, โดยพื้นที่ผิวของเนื้อเยื่อ หลังจากตรึงแล้วเท่ากับ 0.62 cm²) หลังจากนั้นประกอบเข้ากับระบบ Ussing system เพื่อศึกษาการเคลื่อนผ่านของอิเล็กโทรไลต์ และสารน้ำผ่านทางเยื่ออุทกอาหารต่อไป

การประเมินการทำหน้าที่ของเยื่อบุลำไส้ในการขับหลังอิเล็กโทรไลต์

ทำการศึกษาโดยใช้ระบบ Ussing system ซึ่งประกอบด้วย Ussing chamber และ เครื่องควบคุมความต่างศักย์ไฟฟ้า (Voltage clamp) (DVC-4000, World Precision Instrument,

Florida, USA) โดยนำลำไส้ที่ได้จากการเตรียมเนื้อเยื่อมาติดตั้งกับ Ussing chamber-voltage clamp ที่เชื่อมต่อเข้ากับ reservoir ที่บรรจุสารละลาย Ringer's solution ที่ได้รับก๊าซ carbogen และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 °C ตลอดการทดลอง โดยระหว่างที่ทำการทดลองจะมีการเติมสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 10 mM เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน บันทึกหมายเลขหนุทดลองตามลำดับและตำแหน่งของลำไส้ใหญ่ส่วนปลายด้านที่ติดกับส่วน rectum โดยมีลำดับตำแหน่งที่ 1 และมีลำดับเพิ่มขึ้นไปทางลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon) ซึ่งหนูขาวหนึ่งตัวจะมีจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ (ยาวประมาณ 1.5 cm) ประมาณ 7 ถึง 8 ชิ้น

ก่อนเริ่มการกระตุ้นด้วยยาหรือสารสื่อประสาททำการบันทึกค่าทางไฟฟ้าต่างๆ ได้แก่ ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (potential differences PD; mV) ของเนื้อเยื่อด้านท่อ (mucosa) เมื่อเทียบกับด้านฐาน (basolateral หรือ serosa) และค่ากระแสไฟฟ้า (mucosal Isc; $\mu A/cm^2$) ที่เกิดขึ้นบริเวณด้านท่อโดยเกิดจากการผ่านกระแสไฟฟ้าจากอุปกรณ์ voltage clamp ที่กำหนดสภาวะให้ส่งผ่านกระแสไฟฟ้าจนกระทั่งได้ผลลัพธ์ของความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็นศูนย์ ดังนั้นค่า Isc ที่วัดได้จะมีค่าเท่ากับผลรวมของประจุของไอออนโครโลอิลที่เคลื่อนมาปรากฏทางด้าน mucosa นำค่าทั้งสองมาคำนวณหาค่าความต้านทานของเนื้อเยื่อ (tissue epithelial resistance TER; $m\Omega \cdot cm^2$) ตามกฎของ Ohm's law ($V=I/R$) หลังจากค่าทางไฟฟ้ามีระดับคงที่ (ใช้เวลาประมาณ 30 นาที หลังจากติดตั้ง) ทำการหยดสารกระตุ้นแต่ละชนิดคือ capsaicin (3 μM) CGRP (10 μM) หรือ SP (1 μM) ลงในสารละลายใน chamber ด้าน mucosa หรือ serosa ในแต่ละ chamber ทำการบันทึกค่าสูงสุดของค่าการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าเพื่อบ่งชี้ภาวะการเคลื่อนผ่านของไอออนโครโลอิลจากการตอบสนองต่อสารกระตุ้น สำหรับเนื้อเยื่อควบคุมจะทำการทดลองโดยการใส่สารตัวทำละลาย (methanol ปริมาตร 30 μL) หรือไม่ใส่สารกระตุ้นใดๆแต่ยังคงวัดค่าการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าจนการทดลองเสร็จ เพื่อใช้เปรียบเทียบในขั้นตอนการวิเคราะห์และประเมินผล เยื่อลำไส้ที่ไม่มีความผิดปกติจะต้องมีการตอบสนองโดยจะมีค่ากระแสไฟฟ้า Isc เพิ่มขึ้นตอบสนองต่อ capsaicin ซึ่งกระตุ้นรีเฟล็กซ์การขับหลังซึ่งเกิดจากการทำงานของ secretory motor reflex

การสกัดเปปไทด์ และการวัดระดับ CGRP และ Substance P จากลำไส้ใหญ่ และ พลาสมา

การวัดระดับของสารสื่อประสาทชนิด CGRP และ substance P จากเยื่อทางเดินอาหาร และพลาสมา ก่อนทำการวัดสารสื่อประสาทที่แยกได้จากเนื้อเยื่อทำการแยกโปรตีนจากเยื่อลำไส้ นำเนื้อเยื่อมาชั่งน้ำหนักให้ได้ประมาณ 100 มก. แล้วทำการปั่นบดความเร็วสูง (homogenizer) จากนั้นนำมาย่อยสลายด้วยสารละลาย lysis buffer ปริมาตร 500 มล (1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM, Tris HCl, pH 8.0) ที่มีการเติม protease

inhibitor cocktail ความเข้มข้น 1 mg/ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C 20 นาที เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้ต่อไป จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้จากลำไส้ หรือพลาสมาทำให้เจือจางลง 20 หรือ 50 เท่า ด้วยสารละลาย phosphate buffer solution pH 7.4 ตามลำดับ เพื่อทำการวัดระดับของสารสื่อประสาทด้วยชุดตรวจสำเร็จรูปด้วยวิธีการตามคำแนะนำของผู้ผลิต และคำนวณความเข้มข้นที่วัดได้จากลำไส้ใหญ่จากการคำนวณจาก standard curve ของ ตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้น ระหว่าง (CGRP 100-0.01 นาโนกรัม/มล; SP 0.04-25 นาโนกรัม/มล) กับค่า optical density ที่การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nM ด้วยโปรแกรม Microsoft excel คำนวณค่าที่วัดได้จากตัวอย่างทดลองเป็น นาโนกรัม/มล ต่อ น้ำหนักเนื้อเยื่อ 1 มก (ng/ml/mg) โดยในการวัดจะทำการวัดตัวอย่างตัวอย่างเดียวกันอย่างน้อยสองครั้ง (sample duplication)

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำเสนอผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM (standard Error of mean) เปรียบเทียบผลการทดลองใช้วิธีการทางสถิติด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) ตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลอง (comparison multiple test) ด้วย Tukey's multiple comparison post hoc test หรือเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับความเครียดที่ทำให้เกิดความเครียดในช่วงเวลาเดียวกันด้วยวิธี Student t-test ตามความเหมาะสม โดยพิจารณาค่ามีความแตกต่างทางสถิติเมื่อค่า $P < 0.05$ ในการหาความสัมพันธ์ของการสูญเสียความสามารถทำงานของเยื่อหูในการขับหลังอิเล็กโตรไลต์ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น กับระดับสารสื่อประสาทเปปไทด์ในลำไส้ใหญ่ กับพลาสมาในสัตว์ปกติและสัตว์ที่เหนี่ยวทำให้เกิดความเครียด โดยการใช้วิธีสถิติสหสัมพันธ์อย่างง่าย two-tails Pearson's correlation และสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (simple linear regression) โดยพิจารณาค่าที่ความสัมพันธ์ต่อกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ $r > 0$ และค่า $P < 0.05$ โดยค่าตัวแปรที่มีความสัมพันธ์ในระดับสูง เมื่อ $r \geq 0.8$ ระดับปานกลาง $0.3 \leq r < 0.8$ ระดับต่ำ $r < 0.3$ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Prism 5.0 (Graph Pad Software, Inc., California, USA)

ผลการทดลอง

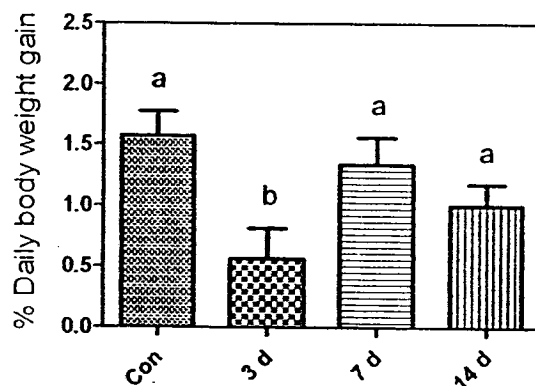
ในการศึกษาบทบาทของความเครียดในระยะต่างๆคือ ความเครียดระยะสั้น 3 วัน (acute stress, 3 d) ความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง 7 วัน (subchronic stress, 7 d) และความเครียดระยะเรื้อรัง 14 วัน (chronic stress, 14 d) ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและการทำงานของระบบปกป้องทางเดินอาหารโดยการเหนี่ยวทำให้เกิดความเครียดแบบชนิดกักขังในหนูขาวเป็นแบบการศึกษาพบการเปลี่ยนแปลงดังนี้

ผลของระยะเวลาในการได้รับความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว

ในการศึกษาผลของความเครียดต่อการเจริญเติบโตโดยการวัดค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวต่อวัน (% Daily body weight gain, % BWG) โดยการคำนวณจากสูตร

$$\% \text{ Daily body weight gain} = \frac{[(\text{น้ำหนักตัววันสุดท้าย} - \text{น้ำหนักตัววันแรก}) \times 100]}{\text{จำนวนวัน}} \\ \text{น้ำหนักตัววันแรก}$$

พบว่าหนูทุกตัวในกลุ่มควบคุม หรือกลุ่มที่ได้รับความเครียดมีค่าการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวในวันสุดท้ายของการทดลองเพิ่มขึ้นจากวันแรกของการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่ค่าเฉลี่ยของการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาของการทดลองเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ยต่อวันของหนูขาวที่ได้รับความเครียดแบบสั้น 3 วันนั้นเท่ากับ 0.57 ± 0.25 % ต่อวัน (นน.ตัวก่อน vs. หลัง, 379.50 ± 8.37 g vs. 386.75 ± 6.19 g) ซึ่งน้อยกว่าการเพิ่มของน้ำหนักตัวของหนูทุกตัวจากกลุ่มควบคุม (%DWG = 1.57 ± 0.20 % ต่อวัน) กลุ่มได้รับความเครียด 7 วัน (%DWG = 1.34 ± 0.22 % ต่อวัน; นน.ตัวก่อน vs. หลัง, 345.50 ± 8.37 g vs. 367.25 ± 5.46 g) หรือได้รับความเครียด 14 วัน (%DWG = 1.01 ± 0.17 % ต่อวัน; นน.ตัวก่อน vs. หลัง, 303.60 ± 6.78 g vs. 352.00 ± 2.12 g) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงผลของความเครียดต่อค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูขาวในกลุ่มควบคุม (Con) และกลุ่มที่ได้รับความเครียด (Stress) ในระยะสั้น (3d) ระยะกึ่งเรื้อรัง (7d) และระยะเรื้อรัง (14d)

แท่งกราฟที่มีตัวอักษร a หรือ b ต่างกันแสดงถึงการมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบด้วย ANOVA และตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Tukey's multiple comparison test

ผลของระยะเวลาในการได้รับความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงค่าทางไฟฟ้าของเนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย

ในการศึกษาวัดกระแสไฟฟ้าต้าน mucosal (mucosal Isc) ในสภาวะที่กำหนดให้ความต่างศักย์เป็นศูนย์ ซึ่งมีค่าเท่ากับผลรวมของการเคลื่อนที่ของอิเล็กโตรไลต์ที่เกิดขึ้นที่บริเวณ mucosa พบว่าหลังจากที่ติดตั้งเนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ส่วนปลายเข้ากับอุปกรณ์แล้วรอจนกระทั่งการทำงานของเยื่อเมือกเข้าสู่ภาวะสมดุลซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทั้งนี้เนื้อเยื่อที่จะสามารถทำการศึกษานั้นถูกประเมินแล้วว่าต้องอยู่ในสภาวะที่ยังทำหน้าที่ได้ โดยพิจารณาจากค่าทางไฟฟ้า (mucosal Isc, PD และ TER) ของเนื้อเยื่อหลังจากติดตั้งบนอุปกรณ์แล้วจะต้องมีค่าไม่เท่ากับศูนย์

ค่ากระแสไฟฟ้าทางต้านเยื่อเมือก (mucosal short circuit current; mucosal Isc)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเยื่อลำไส้ใหญ่ส่วนปลายที่แยกได้จากหนูที่ได้รับความเครียดกลุ่ม 3d, 7d และ 14d มีค่ากระแสทางต้านเยื่อเมือกลดลงมากกว่า 40% เมื่อเทียบกับเยื่อลำไส้ที่แยกได้จากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับความเครียดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูที่ได้รับระยะเวลาความเครียดเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1)

ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (potential difference; PD)

ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่วัดที่ต้านเยื่อเมือกเทียบกับพื้นฐานของเยื่อลำไส้ของหนูขาวที่ได้รับความเครียดทุกกลุ่มจึงมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ไม่พบว่ามีค่าความแตกต่างของค่าความต่างศักย์ที่วัดได้ในหนูที่ได้รับความเครียดที่ระยะต่างๆกัน (ตารางที่ 1)

ค่าความต้านทานไฟฟ้าของเนื้อเยื่อ (tissue epithelial resistance; TER)

การศึกษาค่าความต้านทานไฟฟ้าของเนื้อเยื่อ ทำโดยการคำนวณจากค่ากระแสไฟฟ้าทางต้านเยื่อเมือก (mucosal Isc) และค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (PD) ที่วัดได้ ตามกฎของโอห์ม (Ohm's law, $R=V/I$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ $[1,000 \times (PD/mucosal Isc)]$ หน่วยเป็น $m\Omega \cdot cm^2$ พบว่าเยื่อลำไส้ใหญ่ที่แยกได้จากหนูที่ได้รับความเครียดกลุ่ม 3d และ 7d มีแนวโน้มที่จะมีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนค่าความต้านทานไฟฟ้าของหนูที่ได้รับความเครียดกลุ่ม 14d มีค่าความต้านทานไฟฟ้าของเนื้อเยื่อลดลงมากกว่าทุกกลุ่มโดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับกลุ่มที่ได้รับความเครียด 7 วัน ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย (mean \pm SEM) ของค่าทางไฟฟ้าที่ระยะพักของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ส่วนปลายของหนูขาวในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับความเครียดที่ระยะต่าง ๆ

ค่าทางไฟฟ้าของเนื้อเยื่อ	กลุ่มควบคุม (Con)	กลุ่มได้รับความเครียด		
		3 วัน (3d)	7 วัน (7d)	14 วัน (14d)
ค่ากระแสไฟฟ้า (Isc, mA/cm ²)	72.35 \pm 12.78 ^e	22.05 \pm 2.49 ^b	32.25 \pm 6.13 ^b	31.43 \pm 3.51 ^b
Potential differences (PD, mV)	5.10 \pm 0.92 ^e	1.7 \pm 0.22 ^b	2.8 \pm 0.46 ^b	1.9 \pm 0.24 ^b
Tissue epithelial resistance (TER, m Ω /cm ²)	116.30 \pm 10.13 ^{e,b}	135.80 \pm 17.90 ^{a,b}	213.60 \pm 57.73 ^a	95.19 \pm 8.34 ^b

แท่งกราฟที่แสดงตัวอักษร a, b เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) หรือแท่งกราฟแสดงตัวอักษร a, b ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการทดสอบระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย ANOVA และตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Tukey's multiple comparison test

ผลของระยะเวลาในการได้รับความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงของค่ากระแสไฟฟ้าทางด้านเยื่อเมือก ภายหลังจากใส่สารกระตุ้นชนิดต่าง ๆ

ในการศึกษาผลของความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงระบบขับหลังอิเล็กโตรไลต์จะทำการวัดค่า Isc ที่คงที่ก่อนที่จะใส่สาร และหลังจากที่ทำการกระตุ้นจะวัดการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งสูงสุดหรือต่ำสุดแล้วนำมาคำนวณผลต่างของการเปลี่ยนแปลงกระแสไฟฟ้าที่ตอบสนองต่อสารต่าง ๆ

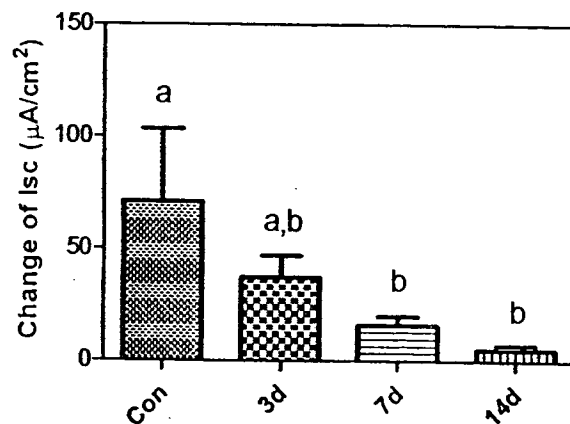
ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ย (mean \pm SEM) การเปลี่ยนทางไฟฟ้าของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ส่วนปลายที่ ได้รับการกระตุ้นด้วยยา หรือสารสื่อประสาทชนิดต่างๆของหนูขาวในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับความเครียดที่ระยะต่างๆ

ค่าการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้า ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	กลุ่มควบคุม (Con)	กลุ่มได้รับความเครียด		
		3 วัน (3d)	7 วัน (7d)	14 วัน (14d)
Capsaicin (CAP)	70.97 \pm 32.47 ^e	37.32 \pm 9.63 ^{a,b}	15.99 \pm 4.12 ^b	5.20 \pm 1.89 ^b
Calcitonin-gene related peptides (CGRP)	52.82 \pm 17.05 ^e	54.92 \pm 14.12 ^e	48.50 \pm 6.00 ^e	101.1 \pm 6.79 ^b
Substance P (SP)	52.45 \pm 9.96	80.41 \pm 19.74	63.50 \pm 18.07	79.15 \pm 26.20

แท่งกราฟที่แสดงตัวอักษร a, b เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) หรือแท่งกราฟแสดงตัวอักษร a, b ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการทดสอบระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย ANOVA และตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Tukey's multiple comparison test

การกระตุ้นรีเฟล็กซ์การขับหลังด้วย capsaicin (CAP)

ในภาวะปกตินั้นเมื่อใส่สารที่กระตุ้นระบบรีเฟล็กซ์การขับหลังชนิด capsaicin (CAP) ตั้งแต่ 1 ถึง 3 μM ลงไปทางด้าน serosa ซึ่งเป็นด้านที่มีระบบประสาทของลำไส้ผู้นั้นจะพบว่ามีการตอบสนองโดยจะพบการเพิ่มขึ้นของ Isc ทันทีหลังจากใส่สารลงไปไม่เกิน 30 วินาที และจะเพิ่มสูงสุด (โดยเฉพาะเมื่อกระตุ้นด้วย CAP 3 μM) แล้วคงที่อยู่ประมาณ 5 นาทีแล้วค่า Isc จะค่อยๆลดกลับลงมาที่ค่าเดิม ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของค่า Isc ของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ที่แยกได้จากหนูกลุ่มควบคุมตอบสนองต่อ CAP 3 μM ทางด้าน serosa โดยเฉลี่ย 70.97 \pm 32.47 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ โดยพบว่า การตอบสนองเยื่อบุลำไส้ใหญ่ที่แยกได้จากหนูกลุ่มที่ได้รับความเครียดทุกกลุ่มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (รูปที่ 2 และตารางที่ 2) นอกจากนี้ยังพบว่า การตอบสนองต่อการกระตุ้นรีเฟล็กซ์การขับหลังนี้ลดลงมากกว่า 70-90% ในเยื่อบุลำไส้ใหญ่ที่แยกได้จากหนูกลุ่มที่ได้รับความเครียดที่ระยะยาวนานขึ้นมากกว่า 7 วัน (รูปที่ 2 และตารางที่ 2)

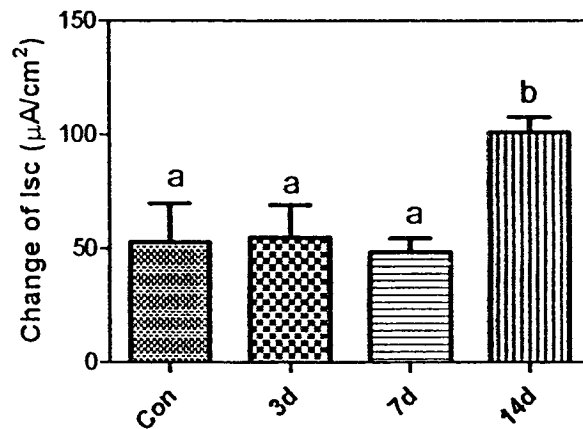


รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ย (mean \pm SEM) ของการเปลี่ยนแปลงของค่ากระแสไฟฟ้าทางด้านเยื่อเมือก (change of Isc) ภายหลังจากใส่สารกระตุ้นรีเฟล็กซ์ชนิด capsaicin (CAP) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มความเครียดระยะสั้น (3d) กลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง (7d) และกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (14d)

แท่งกราฟที่แสดงตัวอักษร a, b เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) หรือแท่งกราฟแสดงตัวอักษร a, b ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการทดสอบระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย ANOVA และตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Newman-Keuls multiple comparison test

การกระตุ้นด้วยสารสื่อประสาทชนิด calcitonin gene-related peptide (CGRP)

เมื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองในการขับหลังอิลคโตรไลต์ที่เป็นส่วนต่างๆของกลไกรีเฟล็กซ์การขับหลัง เริ่มจากกลไกจากการทำงานของสารสื่อประสาทรับความรู้สึกชนิด calcitonin gene-related peptide พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่า Isc ภายหลังจากใส่สาร calcitonin gene-related peptide (CGRP; 10 μ M) ทางด้าน serosa เพิ่มขึ้นสูงสุด คงที่ แล้วลดลงเหมือนกับการกระตุ้นด้วย CAP โดยพบว่ากลุ่มควบคุมกลุ่มที่ได้รับความเครียด 3d และ 7d มีการเปลี่ยนแปลงของค่า Isc ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับความเครียดระยะเรื้อรังจะมีตอบสนองต่อ CGRP 10 μ M มากที่สุด (รูปที่ 3 และตารางที่ 2)

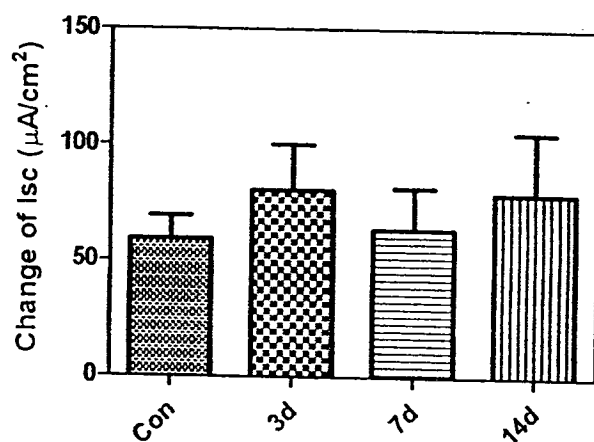


รูปที่ 3 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ย (mean \pm SEM) ของการเปลี่ยนแปลงของค่ากระแสไฟฟ้าทางด้านเยื่อเมือก (change of Isc) ภายหลังจากใส่สารสื่อประสาท calcitonin gene-related peptide (CGRP) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มความเครียดระยะสั้น (3d) กลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง (7d) และกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (14d)

แท่งกราฟที่แสดงตัวอักษร a, b เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) หรือแท่งกราฟแสดงตัวอักษร a, b ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการทดสอบระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย ANOVA และตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Tukey's multiple comparison test

การกระตุ้นด้วยสารสื่อประสาทชนิด Substance P (SP)

เมื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองในการขับหลังอิเล็กโตรไลต์ที่เป็นส่วนต่างๆของกลไกรีเฟล็กซ์การขับหลังผ่านการทำงานด้วยสารสื่อประสาทรับความรู้สึกอีกชนิดคือ substance P (SP; 1 μ M) พบว่าเมื่อให้ SP ทางด้าน serosa จะพบการเพิ่มขึ้นของ Isc เช่นเดียวกับที่พบในการทดสอบข้างต้นแต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการเพิ่ม Isc ตอบสนองต่อ SP ของเยื่อลำไส้ใหญ่ส่วนปลายจากหนูที่ได้รับ ความเครียดแตกต่างไปจากเนื้อเยื่อที่ได้จากหนูกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4 และตารางที่ 2)



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ย (mean \pm SEM) ของการเปลี่ยนแปลงของค่ากระแสไฟฟ้าทางด้านเยื่อเมือก (change of Isc) ภายหลังการใส่สารสื่อประสาท substance P เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มความเครียดระยะสั้น (3d) กลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง (7d) และกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (14d)

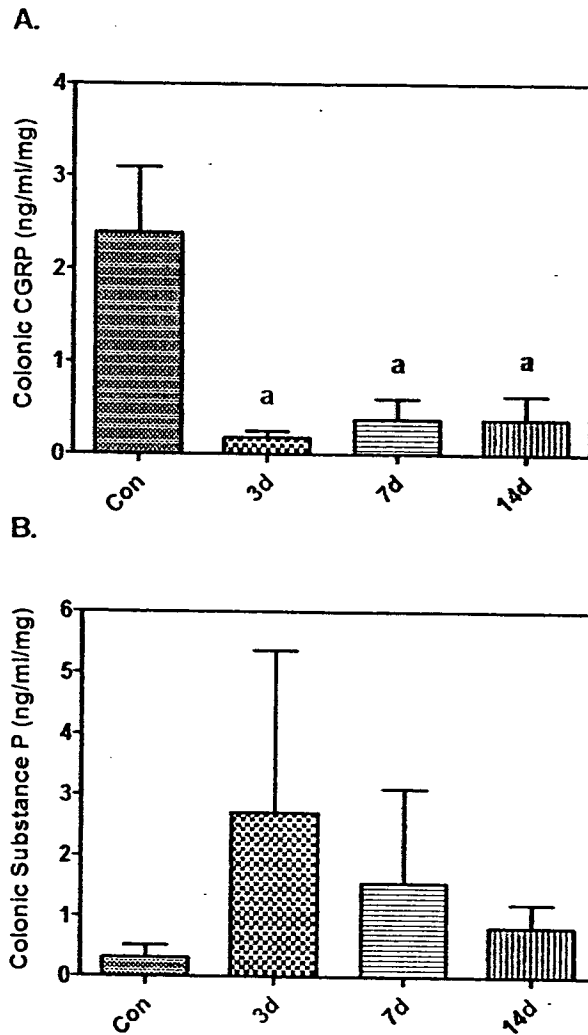
ผลของความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของสารสื่อประสาทเปปไทด์ในเนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ของหนูขาว

Colonic Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

เมื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับของเปปไทด์ CGRP ที่เป็นสารสื่อประสาทสำคัญต่อรีเฟล็กซ์การขับหลัง โดยทำการแยกเปปไทด์จากเยื่อของลำไส้ใหญ่ของหนูขาว พบว่าในหนูกลุ่มควบคุมมีระดับเท่ากับ 2.39 ± 0.71 ng/ml/mg โดยที่ลำไส้ใหญ่จากหนูขาวมีระดับ CGRP ลดลงอย่างมากในหนูขาวที่ได้รับความเครียด 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน อย่างมีนัยสำคัญ (0.18 ± 0.54 , 0.38 ± 1.146 และ 0.39 ± 1.15 ng/ml/mg, $p < 0.05$ ตามลำดับ) (รูปที่ 5A)

Colonic Substance P

ในลำไส้ใหญ่หนูขาวพบว่า Substance P ที่เป็นสารสื่อประสาทสำคัญอีกชนิดที่ควบคุมรีเฟล็กซ์การขับหลังโดยเฉพาะในภาวะที่มีการอักเสบพบว่าในหนูกลุ่มควบคุมมีระดับที่ค่อนข้างต่ำเท่ากับ 0.31 ± 0.20 ng/ml/mg โดยที่ความเครียดไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ Substance P ที่แยกได้จากลำไส้ใหญ่จากหนูขาวจากกลุ่ม 3d 7d และ 14d (2.72 ± 2.65 , 1.56 ± 1.55 และ 0.83 ± 0.39 ng/ml/mg, $p < 0.05$ ตามลำดับ) (รูปที่ 5B)



รูปที่ 5 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ย (mean \pm SEM) ของระดับเปปไทด์ (A) calcitonin gene-related peptide (CGRP; ng/ml/mg) และ (B) Substance P (SP; ng/ml/mg) ที่แยกได้จากเยื่อลำไส้ใหญ่จากหนูขาว เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มความเครียดระยะสั้น (3d) กลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง (7d) และกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (14d)

แท่งกราฟที่แสดงตัวอักษร a เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) หรือแท่งกราฟแสดงตัวอักษร a ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการทดสอบระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย ANOVA และตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Tukey's multiple comparison test

ผลของความเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของสารสื่อประสาทเปปไทด์ในพลาสมา

Plasma Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

ระดับของเปปไทด์ CGRP ในพลาสมา ของหนูชาวปกติมีค่าเท่ากับ 28.52 ± 2.10 ng/ml พบว่าในหนูกลุ่มควบคุม ส่วนระดับของเปปไทด์ CGRP ในพลาสมาของหนูชาวที่ได้รับความเครียด 3 วัน และ 7 วัน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 66.46 ± 11.55 และ 49.38 ± 11.91 ng/ml, $p < 0.05$ ตามลำดับ (รูปที่ 6A) แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มที่ได้รับความเครียด 14 วัน 42.39 ± 7.99 ng/ml ไปจากกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามระดับของเปปไทด์ CGRP ในพลาสมาของหนูชาวที่ได้รับความเครียดที่ 3 วัน 7 วัน และ 14 วัน ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)

Plasma Substance P

สำหรับระดับ Substance P ในพลาสมา นั้นพบว่าในหนูกลุ่มควบคุมมีระดับเท่ากับ 25.01 ± 7.53 ng/ml และเมื่อหนูชาวได้รับความเครียด 3 วัน และ 7 วัน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับพลาสมา Substance P (18.24 ± 6.63 และ 36.90 ± 5.52 และ 0.83 ± 0.39 ng/ml, $p < 0.05$ ตามลำดับ) แต่ในหนูชาวที่ได้รับความเครียด 14 วัน มีระดับพลาสมา Substance P เพิ่มขึ้นเป็น 77.05 ± 39.18 ng/ml, $p < 0.05$) (รูปที่ 6B)

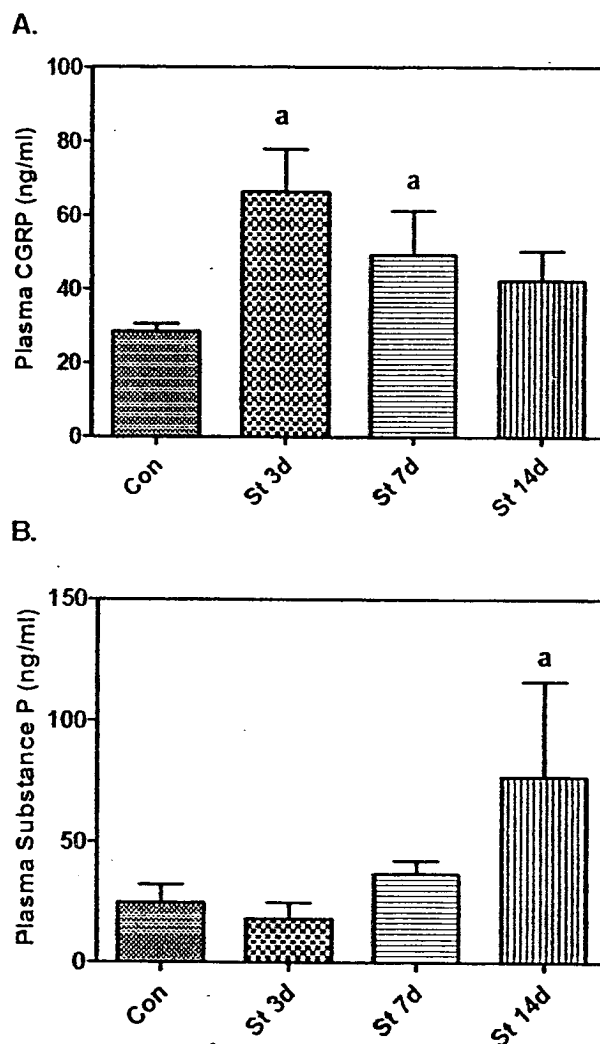
ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของสารสื่อประสาทเปปไทด์ในเนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่กับระดับการตอบสนองของรีเฟล็กซ์การขับหลังของเยื่อบุต่อสิ่งกระตุ้นในหนูที่ได้รับความเครียด

ในการศึกษาครั้งนี้พบการลดลงของทั้งระดับเปปไทด์ CGRP ในลำไส้ใหญ่ และการตอบสนองต่อ capsaicin ในการเพิ่ม Isc ของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ของหนูชาวที่ได้รับความเครียดที่ 3 วัน 7 วัน และ 14 วันอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ระดับของ colonic CGRP มีความสัมพันธ์ต่อการตอบสนองต่อ capsaicin ของเยื่อบุต่อการเปลี่ยนแปลง Isc ในระดับสูง ($r > 0.5$) (รูปที่ 7A) โดยที่การตอบสนองต่อ capsaicin ในการเพิ่ม Isc ของเยื่อบุลำไส้ใหญ่ของหนูชาวที่ได้รับความเครียดที่ 3 วัน 7 วัน และ 14 วันกลับมีความสัมพันธ์ต่อระดับเปปไทด์ Substance P ในลำไส้ใหญ่ในระดับต่ำ ($r < 0.3$) (รูปที่ 7B)

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของสารสื่อประสาทเปปไทด์ในพลาสมา กับระดับการตอบสนองของรีเฟล็กซ์การขับหลังของเยื่อบุต่อสิ่งกระตุ้นในหนูที่ได้รับความเครียด

ในการศึกษาครั้งนี้ความเครียดมีผลเพิ่มพลาสมาเปปไทด์ แต่เมื่อพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงว่ามีความสัมพันธ์ต่อการตอบสนองของเยื่อบุต่อการเพิ่มขึ้นของ Isc พบว่าไม่มี

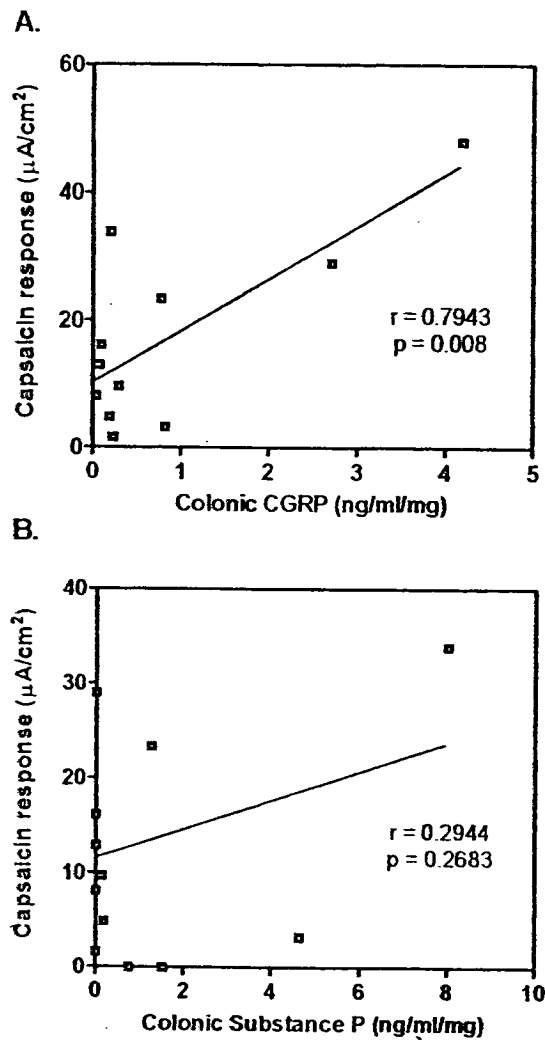
ความสัมพันธ์ต่อระดับ CGRP ในพลาสมา ($r < 0.3$) (รูปที่ 8B) แต่มีความสัมพันธ์ในเชิงลบในระดับปานกลาง ($0.3 \leq r \leq 0.5$) ต่อระดับพลาสมา Substance P กล่าวคือพลาสมาของหนูขาวที่มีระดับ Substance P สูงจะพบว่า การตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย capsaicin $3 \mu\text{M}$ จะลดลง (รูปที่ 8B)



รูปที่ 6 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ย (mean \pm SEM) ของระดับเปปไทด์ (A) calcitonin gene-related peptide (CGRP; ng/ml) และ (B) Substance P (SP; ng/ml) ที่แยกได้จากพลาสมาจากหนูขาวเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มความเครียดระยะสั้น (3d) กลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง (7d) และกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (14d)

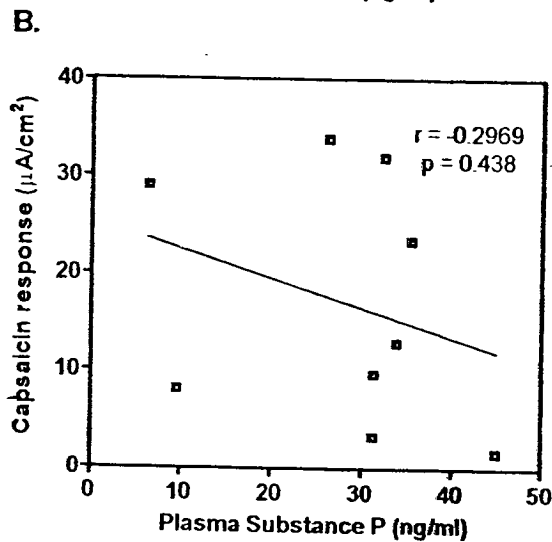
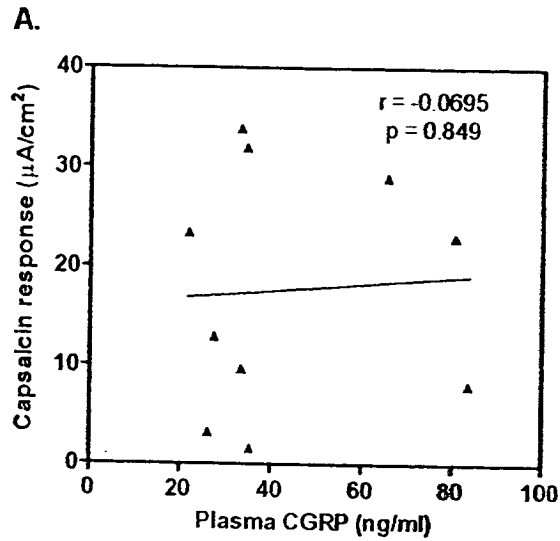
แท่งกราฟที่แสดงตัวอักษร a เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) หรือแท่งกราฟแสดงตัวอักษร a ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p < 0.05$) จากการทดสอบระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย ANOVA และตามด้วยการเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Tukey's multiple comparison test



รูปที่ 7 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเปลี่ยนแปลงของค่ากระแสไฟฟ้าทางด้านเยื่อเมือก (capsaicin response; $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) ภายหลังจากใส่สาร capsaicin 3 μM กระตุ้นรีเฟลกซ์การขับหลังกับ (A) ระดับเปปไทด์ CGRP ในลำไส้ใหญ่ (colonic CGRP; ng/ml/mg) หรือ (B) Substance P ในลำไส้ใหญ่ (colonic Substance P; ng/ml/mg) ที่วัดได้จากลำไส้ใหญ่ของ กลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มความเครียดระยะสั้น (3d) กลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง (7d) และกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (14d) ค่า r แสดงถึงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของตัวแปรทั้งสอง และจะมี

นัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ $p < 0.05$ และแสดงสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (simple linear regression) โดยการทดสอบด้วยการวิธีสถิติสหสัมพันธ์อย่างง่าย two-tails Pearson's correlation



รูปที่ 8 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเปลี่ยนแปลงของค่ากระแสไฟฟ้าทางด้านเยื่อเมือก (capsaicin response; $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) ภายหลังจากใส่สาร capsaicin 3 μM กระตุ้นรีเฟล็กซ์การขับหลังกับ (A) ระดับเปปไทด์ CGRP ในพลาสมา (Plasma CGRP; ng/ml/mg) หรือ (B) Substance P ในพลาสมา (Plasma Substance P; ng/ml/mg) ที่วัดได้จากกลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มความเครียดระยะสั้น (3d) กลุ่มความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง (7d) และกลุ่มความเครียดระยะเรื้อรัง (14d) ค่า r แสดงถึงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของตัวแปรทั้งสอง และจะมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ

$p < 0.05$ และแสดงสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (simple linear regression) โดยการทดสอบด้วยการวิธีสถิติสหสัมพันธ์อย่างง่าย two-tails Pearson's correlation

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของร่างกาย ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงที่ระบบปกป้องของทางเดินอาหาร จากการที่ได้รับความเครียดที่ระยะต่างๆกัน คือที่ระยะสั้น ระยะกึ่งเรื้อรัง และระยะเรื้อรัง ซึ่งใช้แบบการทดสอบเหนี่ยวนำทำให้สัตว์เกิดความเครียดจากจิตใจโดยใช้วิธีการกักขัง (immobilization) ในหนูขาวพบว่าหนูขาวที่เหนี่ยวนำให้ได้รับความเครียดด้วยแบบการศึกษาครั้งนี้ไม่มีการตายหรือแสดงความผิดปกติทางด้านกายภาพ เช่น ไม่แสดงอาการป่วย หรือมีความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร หนูทุกกลุ่มทั้งกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับความเครียดจะมีลักษณะภายนอกไม่แตกต่างกัน ไม่มีอาการคลื่น หรือส่งเสียงร้องใดๆที่แสดงถึงความเจ็บปวด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของแบบการศึกษานี้ว่าเป็นการเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิดความเครียดในด้านจิตใจ (emotional stress) มากกว่าทางกายภาพ (physical stress) ดังนั้นผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จึงสามารถนำมาใช้เปรียบเทียบสอดคล้องกับภาวะความเครียดของสัตว์เลี้ยงที่เกิดจากจิตใจ เช่น สัตว์ที่ถูกกักขัง หรือปล่อยทิ้งให้อยู่ตัวเดียวเป็นเวลานาน เป็นอย่างดี

ความเครียดที่เกิดจากภาวะทางอารมณ์ (psychological stress) ที่เกิดขึ้นกับร่างกายนั้นทำให้มีการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (corticosterone) ออกมาจากต่อมหมวกไตซึ่งเป็นปฏิกิริยาการตอบสนองของร่างกาย ปริมาณฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรนนี้สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดความเครียดในคนและสัตว์ (Eriksson, 2004) โดยความเครียดที่เกิดขึ้นจะผ่านกลไกการกระตุ้นจากสมองผ่านระบบ hypothalamic-pituitary-adrenal gland axis (HPA) โดยความเครียดที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นไฮโปทาลามัส (hypothalamus) ในสมองจะทำให้เกิดการหลั่ง corticotrophin-releasing hormone (CRH) ไปกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) ให้หลั่ง adrenocorticotropin-releasing hormone (ACTH) ซึ่ง ACTH จะผ่านกระแสโลหิตไปที่ต่อมหมวกไต (adrenal gland) ทำให้มีการหลั่ง corticosterone ออกมา ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกับผลการศึกษาในครั้งนี้คือ ในช่วงความเครียดระยะสั้น 3 วัน (acute stress) และความเครียดระยะกึ่งเรื้อรัง 7 วัน (subchronic stress) หรือความเครียดระยะเรื้อรัง 14 วัน (chronic stress) พบว่าปริมาณ corticosterone เพิ่มขึ้นจากปกติ (ไม่ได้รายงานผล) และใช้เป็นค่าในการประเมินว่าหนูมีความเครียดเกิดขึ้นจึงจะนำมาแยกลำไส้ใหญ่เพื่อใช้ในการทดลอง การที่หนูได้รับความเครียดทั้งนี้อาจเป็นเพราะความเครียดมีผลต่อการเพิ่มการทำงานของระบบประสาทซิมพาเทติก และการเพิ่มการหลั่ง CRH ที่มีผลในการลดความอยากอาหารลง (Rybkina et al., 1997) แต่เมื่อทำให้เกิดความเครียดยาวนานขึ้นนั้นจะมีการหลั่ง corticosterone มากขึ้นยาวนาน ฮอร์โมน corticosterone โดยปกติมีผลโดยตรงต่อระบบ metabolism ทำให้เกิด catabolic effect และ anti-anabolic effects ทำให้เกิด negative nitrogen balance และการสลายไขมัน lipolysis ทั่วร่างกาย ส่งผลให้น้ำหนักตัวลดลงได้ แต่อาจมีการสะสม

ของไขมันบางส่วน แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่ากลุ่มที่ได้รับความเครียด 7 และ 14 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ทั้งนี้อาจเป็นผลจากฮอร์โมน corticosterone ซึ่งมีผลยับยั้ง leptin ซึ่งยับยั้งศูนย์ควบคุมการกินอาหารที่สมองส่วนกลาง (Arvaniti et al., 1998) ดังนั้นจึงทำให้ไม่พบว่ามี การลดลงของน้ำหนักตัวในหนูกลุ่มที่ได้รับความเครียดระยะสั้นมีการเพิ่มของน้ำหนักตัวน้อยที่สุด ถึงแม้ว่าการศึกษาครั้งนี้มีความสนใจการเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อทางเดินอาหารเฉพาะส่วนลำไส้ใหญ่เท่านั้น เนื่องจากบริเวณนี้มีจุลินทรีย์อยู่เป็นจำนวนมาก ร่วมกับเป็นบริเวณที่มีความสัมพันธ์ต่อระบบปกป้องและสารขับหลังต่างๆ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการผ่านเข้าออกของสารน้ำ และอิเล็กโทรไลต์ อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัดว่า การเปลี่ยนแปลงแบบนี้จะเกิดขึ้นที่บริเวณส่วนของลำไส้เล็กที่มีความเกี่ยวข้องกับการดูดซึมสารอาหารและมีความสัมพันธ์ในการทำให้เกิดน้ำหนักตัวที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมหรือไม่ ซึ่งสมควรจะได้มีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงในบริเวณลำไส้เล็กตอบสนองต่อความเครียดที่ระยะต่างในอนาคต

การศึกษานี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบปกป้องของเยื่อทางเดินอาหารที่ตอบสนองต่อสารกระตุ้นรีเฟล็กซ์ และสารสื่อประสาทที่ควบคุมการทำงานของระบบปกป้องของเยื่อทางเดินอาหาร โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของค่า Isc (mucosal short circuit current; mucosal Isc) คือค่าของปริมาณกระแสไฟฟ้าจากภายนอกที่ปล่อยเข้าสู่ด้าน mucosa เพื่อทำให้เกิดความต่างศักย์ของด้าน mucosa เทียบกับ serosa เป็นศูนย์ (zero voltage clamp) ดังนั้นค่า mucosal Isc จึงมีค่าเท่ากับผลรวมของการเคลื่อนที่ของอิเล็กโทรไลต์ที่เกิดขึ้นที่บริเวณ mucosa ค่า Isc ที่เพิ่มขึ้นหมายถึงมีการขับหลังสารที่มีประจุลบ (Cl^- , HCO_3^- และโปรตีน) มากขึ้นและหรือมีการดูดกลับสารที่มีประจุบวก (Na^+ และ K^+) เพิ่มขึ้น จึงทำให้วงจรกระแสไฟฟ้าถูกเปิดออก (open short circuit) ทำให้ส่งกระแสไฟฟ้าลงไปที่แท่ง electrode ที่เชื่อมต่อกับสารละลายที่อาบอยู่ที่เยื่อบุด้าน mucosa แล้วทำให้ประจุลบแตกออกมาจากแท่ง electrode ที่ทำจาก AgCl_2 ของชุดอุปกรณ์ voltage clamp มาที่บริเวณ mucosa เพื่อทำให้ค่าความต่างศักย์กลับมาอยู่ที่ระดับศูนย์ (zero voltage clamp) เช่นเดิมจึงทำให้พบการเพิ่มขึ้นของ Isc หลังจากการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นดังกล่าวแต่ถ้าค่า Isc ลดลงย่อมหมายถึงการเปลี่ยนแปลงในทิศทางตรงกันข้าม (Cotton and Russ, 1996; Lewis, 1996) ผลการศึกษาการวัดค่ากระแสไฟฟ้า mucosal Isc ของเนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย พบว่าค่ากระแสไฟฟ้าในระยะพัก (basal Isc) ที่ไม่มีการกระตุ้นระบบประสาททางเดินอาหารของหนูในกลุ่มที่ได้รับความเครียดระยะสั้น ระยะกึ่งเรื้อรัง และระยะเรื้อรังไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 1) และเมื่อเทียบกับค่ากระแสไฟฟ้าในหนูกลุ่มควบคุมพบว่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลของการลดลงของ Isc อาจบ่งชี้ถึงการทำงานของระบบปกป้องทางเดินอาหารแบบขับหลังสารที่เสียไป ในทางตรงกันข้ามถ้ามีการลดลงของ Isc นั้นมีสาเหตุมาจากการลดการหลังสารที่มีประจุลบ หรือการดูดกลับสารที่มีประจุบวกลดลง ดังนั้นการขับหลังสารที่มีประจุลบลดลงย่อมส่งผลในการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างในท่อทางเดินอาหารได้

ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการประเมินคุณสมบัติเบื้องต้นของเยื่อบุด้วยการวัดค่า PD (potential difference) ที่บริเวณ mucosa เทียบกับความต่างศักย์ไฟฟ้าที่บริเวณ serosa (reference or ground electrode) การเปลี่ยนแปลงของสารอิเล็กโทรไลต์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประจุส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า PD เนื่องจากเยื่อบุลำไส้ใหญ่ส่วนปลายจะดูดซึม Na^+ และขับหลัง Cl^- และ HCO_3^{2-} นอกจากนี้ค่า PD ยังสามารถบ่งชี้ถึงการหลวมหรือแน่นตัวของเยื่อบุได้อีกด้วย เนื่องจากการเรียงตัวที่แน่นจะทำให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของเยื่อบุสองด้านต่างกันมาก แต่ถ้าวัดค่า PD มีค่าเข้าใกล้ 0 mV นั้นแสดงว่าเยื่อบุค่อนข้างหลวมตัวจึงทำให้อิเล็กโทรไลต์ที่ขับหลังหรือดูดกลับผ่านเซลล์เยื่อบุ (transepithelial) แพร่ผ่านระหว่างเยื่อบุ (paracellular) จนเข้าสู่สมดุลทำให้ไม่เกิดความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ออย่างไรก็ตามค่า PD ไม่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่แน่นอนถึงความแน่นหรือการหลวมตัวของเยื่อบุได้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มาจาก การดูดกลับหรือการขับหลังอิเล็กโทรไลต์เป็นสำคัญ (Lewis, 1996; Nusrat et al., 2000) ในการศึกษานี้พบว่ากลุ่มที่ได้รับความเครียดทุกกลุ่มจะมีค่า PD น้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 1) ซึ่งมีสาเหตุการขับหลังสารที่มีประจุลบลดลงสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงค่า Isc อย่างไรก็ตามการลดลงของค่า PD ไม่น่าเกิดจากการหลวมหรือแน่นตัวของเยื่อบุเนื่องจากในการคำนวณค่า TER ซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงความต้านทานของเยื่อบุที่ส่วนหนึ่งเกิดจากการทำงานของ tight junction protein ที่ทำให้เกิดการมัดแน่นของเยื่อบุลำไส้ ไม่พบว่ามี การเปลี่ยนแปลงของค่า TER ที่คำนวณได้ในเยื่อบุของหนูที่ได้รับความเครียดแตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม แต่การที่เยื่อบุที่แยกได้จากกลุ่ม 14d มีค่าเพิ่มขึ้นนั้นอาจสามารถอธิบายได้ว่าการยอมให้มีการเคลื่อนผ่านของอิเล็กโทรไลต์เข้า-ออกทางเซลล์ลดลงอย่างมากโดยเฉพาะการไม่ยอมให้มีการเคลื่อนของ Cl^- หรือ HCO_3^{2-} ไปยังด้านท่อ เนื่องจากค่า TER เปลี่ยนแปลงไปตามค่า PD และ Isc ที่ลดลงตามกัน แต่มีได้หมายถึงว่าการมัดตัวของ tight junction มากขึ้นเพราะถ้าเป็นจากสาเหตุดังกล่าวน่าจะพบว่าการเพิ่มของค่า PD ด้วย

ผลการศึกษาและกลไกที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นการทำงานของระบบรีเฟล็กซ์และสารสื่อประสาทของระบบรีเฟล็กซ์สามารถอธิบายได้ดังนี้

ผลของการกระตุ้นรีเฟล็กซ์การขับหลังด้วย 8-methyl-vanillyl-6-nonenamide (capsaicin) ขนาดความเข้มข้น 3 μM ทางด้าน serosa นั้นพบว่ากลุ่มควบคุมมีการเพิ่มขึ้นของ Isc เป็นอย่างมากซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาครั้งแรกที่อธิบายถึงการตอบสนองของระบบประสาททางเดินอาหาร (ENS) ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวใน descending colon ของหนูขาว (Yarrow et al., 1991) โดยในการศึกษาดังกล่าวได้บ่งชี้ว่ากลไกการออกฤทธิ์โดยทำงานที่ตัวรับ vanilloid receptor บนเส้นประสาทรับกระตุ้นของระบบประสาท และอาจกระตุ้นผ่าน mast cells หรือกระตุ้นโดยตรงที่เยื่อบุ (Maggi et al., 1987) ดังนั้นเมื่อหนูที่ได้รับความเครียดโดยเฉพาะในระยะกึ่งเรื้อรัง หรือเรื้อรังไม่มีการตอบสนองต่อ capsaicin (ลดลงมากกว่า 70% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม)

อาจจะบ่งชี้ถึงความผิดปกติของเซลล์ และ/หรือปลายประสาทรับความรู้สึก หรือเยื่อเองซึ่งอาจทำให้การทำงานของระบบปกป้องทางเดินอาหารแบบขับหลังสารสำคัญต่างๆเสียหายไปด้วย

จากผลการทดลองดังกล่าวนี้สามารถอธิบายได้ด้วยผลของระดับ colonic CGRP ที่แยกได้จากลำไส้ใหญ่ว่าลดลงมากกว่า 90% ในหนูที่ได้รับความเครียดในทุกกลุ่ม (รูปที่ 5A) โดยที่การลดลงของระดับ colonic peptides มีความสัมพันธ์ในเชิงสถิติ (รูปที่ 7A) โดยที่การลดลงของระดับ colonic CGRP อาจเกิดจากผลของการเสียหายของระบบประสาทรับความรู้สึก (sensory nerve) ซึ่งเป็นส่วนที่ผลิต CGRP ที่สำคัญในลำไส้ ความเสียหายของระบบประสาท (nerve degeneration) จากผลของความเครียดนั้นสามารถเกิดขึ้นได้และมีรายงานว่า เป็นผลเนื่องมาจาก epinephrine และ corticosterone ที่หลั่งออกมาในขณะที่ได้รับความเครียดแบบเฉียบพลันนั้นทำให้เกิด ischemia ขึ้นแบบเฉียบพลันส่งผลให้ระดับ ATP ของเซลล์ต่างๆลดลงโดยเฉพาะของระบบประสาทส่วนกลาง (Duman et al., 1999) ถึงแม้ว่าจะยังไม่มีรายงานดังกล่าวในส่วนของระบบทางเดินอาหาร แต่เหตุการณ์นี้อาจจะพบได้เช่นเดียวกันกับระบบประสาทที่เลี้ยงลำไส้ด้วย จึงทำให้พบการทำงานที่ลดลงเลยในตั้งแต่ช่วงระยะความเครียดในระยะสั้น ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในการได้รับความเครียดที่ระยะกลาง และระยะเรื้อรังนั้นก็ เป็นผลมาจากผลของ corticosteroid ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ของ corticosteroid ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้ว โดยในการระดับของ plasma CGRP นั้นมีการเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อได้รับความเครียดซึ่งไม่เคยมีในรายงานการศึกษาในผ่านมา แต่อาจเป็นไปได้ว่าผลของ corticosteroid โดยตรงที่มต่อการสังเคราะห์ CGRP ตามเนื้อเยื่อต่างๆได้ดังตัวอย่างที่พบว่าการสังเคราะห์ CGRP ที่ผิวหนังเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับความเครียดจากความร้อน (Tsuchiya et al., 1996) แต่ในรายงานการศึกษาดังกล่าวกลับพบว่าแบบการศึกษาโดยการกักขังให้หนูขาวได้รับความเครียดทางจิตใจโดยการกักขังแบบเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้นั้นไม่พบว่าการเพิ่มขึ้นของ CGRP ที่ผิวหนังถึงแม้ว่าจะมีการเพิ่มขึ้นของ corticosteroid ก็ตาม หรืออาจเป็นไปได้ว่าที่จริงแล้วมีการเพิ่มการสังเคราะห์ และการหลั่งของ CGRP ออกจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆรวมทั้งเส้นประสาทที่เลี้ยงลำไส้ด้วย โดยมีรายงานบ่งชี้ถึงว่าการได้รับความเครียดทำให้เกิดการตุ้นของปลายประสาทรับความรู้สึกและทำให้มีการหลั่ง CGRP และ substance P ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากการทำงานของ corticotropin releasing factor ที่สังเคราะห์จาก immune cells หรือเนื้อเยื่อที่อยู่รอบๆกับเส้นประสาท (Theoharides et al., 1995) และผลกระตุ้นการทำงานของเซลล์ประสาทรับความรู้สึกดังกล่าวทำให้เกิด mitochondrial dysfunction หรือเกิดภาวะที่เรียกว่า excitotoxicity ของเซลล์ทำให้ CGRP จากบริเวณต่างๆ เคลื่อนย้ายมาที่ระบบไหลเวียนเลือดซึ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงแรกๆ แล้วจึงค่อยถูกกำจัดออกไปจากร่างกาย (metabolization and clearance) จึงเห็นได้ว่าระดับ plasma CGRP จะลดลงจนไม่มีความแตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม ดังนั้นการตรวจพบระดับ plasma CGRP ที่เพิ่มขึ้นจำนวนมากอาจจะใช้เป็นค่าที่สามารถพยากรณ์การเกิดปรากฏการณ์ excitotoxicity ของเซลล์ประสาทรับความรู้สึกได้

สำหรับในภาวะปกติ Calcitonin gene-related peptide (CGRP) เป็น 37 amino acid peptide ที่สร้างขึ้นในเนื้อเยื่อบางชนิดกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อระบบประสาทส่วนกลาง และระบบประสาทส่วนปลาย สามารถพบได้มากที่ enteric nervous system ของทางเดินอาหาร (Hokfelt et al., 1992; Sternini, 1992; Van Rossum et al., 1997) แต่ไม่ควรจะตรวจพบในพลาสมามากนักโดยยังไม่เคยมีรายงานถึงค่าปกติของ plasma CGRP มาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้ยังทำการศึกษาดูด้วยอีกว่าการสูญเสียหน้าที่ของ secretory-motor reflex นั้นเกิดจากการเสียหายของ ระบบประสาทหรือที่เยื่อของลำไส้ พบว่าภายหลังใส่ CGRP ทางด้าน serosa ทำให้ค่ากระแสไฟฟ้าในทุกกลุ่มการทดลองเพิ่มขึ้นจาก basal Isc สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ (Cooke, 1992) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ากลุ่มที่ได้รับความเครียดระยะเรื้อรังมีการตอบสนองต่อ CGRP สูงที่สุด ($p < 0.05$) (รูปที่ 3) ซึ่งผลของการเพิ่มขึ้นของกระแสไฟฟ้าในกลุ่มที่ได้รับความเครียดระยะเรื้อรังอาจจะบ่งชี้ถึงการเพิ่มการทำงานของระบบปกป้องทางเดินอาหารแบบขับหลังสารแทนที่จะเกิดการเสียหายของเยื่อเอง เพราะถ้ามีความเสียหายเกิดขึ้นจะไม่สามารถกระตุ้นการทำงานได้ด้วย CGRP โดยผลที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงค่ากระแสไฟฟ้าและการขับหลังสอดคล้องกับรายงานการศึกษาทั้งแบบ in vivo (Cox et al., 1989) และ in vitro ในสัตว์หลายชนิด มีรายงานว่า CGRP ทำให้เกิดการขับหลัง Cl^- ในเยื่อลำไส้ใหญ่ของคน (Cox and Tough, 1994) นอกจากนี้ยังมีรายงานการออกฤทธิ์ของ CGRP ในตัวสัตว์ต่อระบบปกป้องโดยทำให้เกิดการเพิ่มและขยายหลอดเลือดที่ระบบทางเดินอาหาร (Cooke, 1992; Holzer, 1998) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มการทำงานของระบบเป้าหมายของการออกฤทธิ์ของ CGRP ซึ่งอาจหมายถึงโปรตีนขนส่งคลอไรด์ และระบบที่เกี่ยวข้องกับเซลล์เยื่อ enterocyte อาจได้รับอิทธิพลจากฮอร์โมนของระบบความเครียดที่มีระยะยาวนานแล้วถูกปรับเปลี่ยนให้ทำงานมากขึ้น

Substance P (SP) เป็นสารสื่อประสาทอีกชนิดที่หลั่งมาจากปลายประสาทรับสัมผัส (sensory nerve) โดยทั่วไป substance P ทำให้เกิดการตอบสนองแบบ acute inflammatory โดยไปกระตุ้นทำให้เกิดการแตกตัวของ mast cell ซึ่งมักจะพบมากบริเวณผิวหนังและเยื่อเมือกทำให้เกิดการหลั่ง inflammatory mediators ต่างๆ เช่น histamine bradykinin ทำให้เกิดผลตามมารวมถึงการกระตุ้นการหลั่งคลอไรด์จากเยื่อทางเดินอาหาร (McFadden et al., 1986) โดย substance P สามารถออกฤทธิ์โดยการกระตุ้นผ่านการทำงานของ Acetylcholine หรือสารสื่อประสาทชนิดอื่นอีกด้วย หรือแม้กระทั่งกระตุ้นการทำงานของเยื่อได้โดยตรง (Cooke, 1992) ในการศึกษาพบว่า การตอบสนองของการขับหลังต่อ Substance P ไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 4) ดังนั้นจึงอาจสามารถบ่งชี้ได้ว่าแม้การตอบสนองต่อ capsaicin ต่อการขับหลังคลอไรด์จะลดลงซึ่งในการทำงานจะมีความเกี่ยวข้องกับ substance P แต่ความผิดปกตินั้นไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงไปของระบบที่เกิดจากการทำงานของสารสื่อประสาท substance P สำหรับความสำคัญของการเปลี่ยนแปลงของระดับ Substance P ในลำไส้ใหญ่นั้นพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงแตกต่างไปจากระดับ colonic CGRP โดยระดับ colonic Substance P ของลำไส้ของ

หนูขาวที่ได้รับความเครียดไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากลำไส้ของหนูกลุ่มควบคุม (รูปที่ 5B) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้จะพบว่า มีระดับ Plasma Substance P เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับความเครียดเรื้อรัง 14 วัน การเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติเป็นอย่างมาก และการเพิ่มขึ้นของ plasma Substance P สอดคล้องกับการตอบสนองที่ลดลงของเยื่อบุลำไส้ต่อ capsaicin ที่ลดลงด้วย แต่อย่างไรก็ตามในรายงานการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของ colonic Substance P และ plasma Substance P ไปในรูปแบบเดียวกับระดับการเปลี่ยนแปลงของ CGRP ได้ทั้งที่ Substance P มักจะหลั่งออกพร้อมกับ CGRP จากปลายประสาทรับความรู้สึกที่เดียวกัน ทั้งนี้ อาจจะเป็นไปได้ว่าโดยปกติระดับของ Substance P อยู่ในระดับที่ต่ำมาก ($< 1\text{ng/ml}$) (รูปที่ 5B) และมีการขับหลั่งออกมาอย่างมากภายหลังจากได้รับความเครียด แต่ก็ยังมีระดับที่ยังไม่สามารถตรวจสอบได้เนื่องจากความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบแต่เมื่อมีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่กระแสโลหิตก็จะมี การสะสมอยู่และถูกทำลายช้ากว่า CGRP ก็เป็นได้จึงสามารถตรวจพบว่ามีเพิ่มขึ้นอย่างมากในกลุ่มที่ได้รับความเครียดในระยะเรื้อรัง

ดังนั้นจากการศึกษาผลของความเครียดระยะต่างๆต่อการเปลี่ยนแปลงระบบปกป้องเยื่อบุทางเดินอาหารในครั้งนี้ทำให้ทราบว่า การได้รับความเครียดแม้เพียงในระยะสั้นก็ตามทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยการลดลงของระดับของสารสื่อประสาทรับความรู้สึกชนิด CGRP ซึ่งเป็นระบบประสาทที่ควบคุม และตอบสนองต่อการกระตุ้นที่ทำให้เกิดการขับหลั่งอิเล็กโตรไลต์ โดยเฉพาะระบบประสาทรับสัมผัส (afferent neurons) โดยที่ไม่มีความเสียหายต่อการทำงานของเยื่อบุทางเดินของลำไส้ใหญ่เนื่องจากการขนส่งของอิเล็กโตรไลต์ ที่ประเมินจากค่า Isc ที่ตอบสนองต่อสารสื่อประสาทชนิดต่างๆของเยื่อบุที่แยกได้จากกลุ่มควบคุม และได้รับความเครียดไม่มีความแตกต่างกัน โดยที่การเปลี่ยนแปลงนี้จะมี ความรุนแรง และการทำหน้าที่ผิดปกติไปจากเดิมเมื่อระยะเวลาที่ได้รับความเครียดยาวนานขึ้น และเนื่องจากระบบประสาททั้งสองระบบนี้เป็นส่วนที่มีความเชื่อมโยงกับระบบประสาทส่วนกลางที่สำคัญ ดังนั้นความเปลี่ยนแปลง และการสูญเสียสภาพนี้อาจก่อให้เกิดผลเฉพาะต่อการป้องกันจากสิ่งแปลกปลอม หรือ เชื้อโรคต่างๆในทางเดินอาหาร และส่งผลในวงกว้างต่อระบบการทำงานอื่นๆของร่างกาย (systemic effects) อีกด้วย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถตรวจวัดได้จากวิธีการตรวจวัดระดับ CGRP ที่เพิ่มขึ้นในพลาสมา หรือโดยเฉพาะอย่างยิ่งมีการเพิ่มขึ้นของระดับ Substance P ในพลาสมาที่สามารถใช้พยากรณ์ได้ว่าสัตว์ได้รับความเครียดมาอย่างเรื้อรัง และมีการทำงานของระบบปกป้องต่อสิ่งกระตุ้นลดลงแล้ว ผลจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นประโยชน์ในการอธิบายการเกิดโรคและบ่งชี้ถึงแนวทางการรักษาเพื่อฟื้นฟูระบบประสาทเพื่อรักษาความผิดปกติต่างๆในสัตว์ที่ได้รับความเครียดได้เป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (RD_34_53_31) รศ.สพ.ญ. ดร.สุทธาสินี ปุญญโชติ ประจำปี 2554-2555 ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณ นางสาวอภิญญา พิมพ์พิพัฒน์ นางสาวณิชนันท์ อักษรสาร และ นายเมธัส วชิระจงกล นิสิตชั้นปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากโครงการเสริมทักษะการวิจัย ปีการศึกษา 2554 และ และคุณนรวิร์ บัวทอง นักวิทยาศาสตร์ผู้ช่วย ที่ช่วยทำการเก็บตัวอย่างสำหรับทดลองในครั้งนี้ รวมทั้งภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับความเอื้อเฟื้อในด้านสถานที่ตลอดจนอุปกรณ์สำหรับการทดลองทุกขั้นตอน ขอขอบคุณ รศ.ดร.ฉัตรศรี เดชะปัญญา ที่ให้คำแนะนำด้านเทคนิคการใช้อุปกรณ์

เอกสารอ้างอิง

- Arvaniti, K., Ricquier, D., Champigny, O. and Richard, D.1998 .Leptin and corticosterone have opposite effects on food intake and the expression of UCP1 mRNA in brown adipose tissue of *lep(ob)/lep(ob)* mice. *Endocrinology*.139(9):4000-3.
- Bulut, K., Felderbauer, P., Deters, S., Hoeck, K., Schmidt-Choudhury, A., Schmidt, W.E. and Hoffmann, P. Sensory neuropeptides and epithelial cell restitution: the relevance of SP- and CGRP-stimulated mast cells. *Int. J. Colorectal.*, 23:535-541, 2008.
- Cooke, H.J. 1989. Role of the little brain in the gut in water and electrolyte homeostasis. *FASEB J*. 138: 127-138.
- Cooke, H.J. 1992. Calcitonin gene-related peptides: influence on intestinal ion transport. *Ann.N.Y. Acad. Sci*. 657: 313-318.
- Cotton, C.U. and Russ, L. 1996. Characterization of epithelial ion transport. In: Wills N.K.,Russ L., Lewis S.A., eds *Epithelial Transport: Guide to methods and experimental analysis*. 1ed. London: Chapman & Hall. pp.71-92.
- Cox, H.M. and Tough, I.R. 1994. Calcitonin gene-related peptide receptors in human gastrointestinal epithelia. *Br. J. Pharmacol*.113(4):1243-1248.
- Cox, H.M., Ferrar, J.A. and Cuthbert, A.W. 1989. Effects of alpha- and beta-calcitonin gene-related peptides upon ion transport in rat descending colon. *Br. J. Pharmacol*. 97: 996-998.
- Duman,R.S., Malberg, J. and Thome, J. 1999. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment, *Biological Psychiatry*, Vol. 46, Issue 9, 1 pp 1181-1191.

- Eriksson, E., Royo, F., Lyberg, K., Carlsson, H.E. and Hau, J. 2004. Effect of metabolic cage housing on immunoglobulin A and corticosterone excretion in faeces and urine of young male rats. *Exp. Physiol.* 89:427-433.
- Hokfelt, T., Arvidsson, U., Ceccatelli, S., Cortes, R., Cullheim, S., Dagerlind, A., Johnson, H., Orazzo, C., Piehl, F. and Pieribone, V. 1992. Calcitonin gene-related peptide in the brain, spinal cord, and some peripheral systems. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 657: 119-134.
- Holzer, P. Implications of trachykinins and calcitonin gene-related peptide in inflammatory bowel disease. *Digest.* 59:269-283, 1998..
- Lewis, S.A. 1996. Characterization of epithelial ion transport. In: Wills N.K., Russ L., Lewis S.A., eds *Epithelial Transport: Guide to methods and experimental analysis.* 1ed. London: Chapman & Hall. pp.1-20.
- Maggi, C.A., Meli, A. and Santicioli, P. 1987. Four motor effects of capsaicin on guinea-pig distal colon. *Br. J. Pharmacol.* 90 : 651 -660.
- McFadden, D., Zinner, M.J. and Jaffe B.M. 1986. Substance P-induced intestinal secretion of water and electrolytes. *Gut.* 27: 267-272.
- Nusrat, A., Turner, J.R. and Madara, J. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am. J. Physiol. Gastro. Liv. Physiol.* 279: 851-857.
- Ottaway, C.A. 1991. Neuroimmunomodulation in the intestinal mucosa. In: *Mucosal immunology I: Basic principles.* Salmi, M and Jalkanen, eds., CRC press, USA. pp. 515-529..
- Perdue, M.H. and MacKay, D.M. 1994. Integrative immunophysiology in the intestinal mucosa. *Am. J. Physiol.* 267:G151-G165.
- Rybkin, I.I., Zhou, Y., Volaufova, J., Smagin, G.N., Ryan, D.H. and Harris, R.B. 1997. Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day. *Am. J. Physiol.* 273:R1612-622.
- Sternini, C. 1992. Enteric and visceral afferent CGRP neurons. Targets of innervation and differential expression patterns. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 657: 170-186..
- Stucchi, A.F., Shebani, K.O., Leeman, S.E., Wang, C.C., Reed, K.L., Fruin, A.B., Gower, A.C., McClung, J.P., Andry, C.D., O'Brien, M.J., Pothoulakis, C. and Becker, J.M. 2003. A neurokinin 1 receptor antagonist reduces an ongoing ileal pouch

- inflammation and the response to a subsequent inflammatory stimulus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 285:G1259-1267.
- Theoharides, T.C, Spanos, C., Pang, X., Alferes, L., Ligris, K., Letourneau, R., Rozniecki, J.J, Webster, E. and Chrousos, G.P. 1995. Stress-induced intracranial mast cell degranulation: a corticotropin-releasing hormone-mediated effect. *Endocrinology.* 136(12):5745-5750.
- Tsuchiya, T., Kishimoto, J., Granstein, R.D, and Nakayama, Y. 1996. Quantitative analysis of cutaneous calcitonin gene-related peptide content in response to acute cutaneous mechanical or thermal stimuli and immobilization-induced stress in rats. *Neuropeptides.* 30(2):149-157.
- Van Rossum, D., Hanisch, U.K. and Quirion, R. 1997. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21: 649-678.
- Yarrow, S., Ferrar, J.A. and Cox, H.M. 1991. The effects of capsaicin upon electrogenic ion transport in rat descending colon. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 344:

ภาคผนวก

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการ

1 ชื่อ นางสาวสุทธาสินี ปุญญโชติ

Miss Sutthasinee Poonyachoti

2. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3 1007 00717 41 6

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาสัตววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนอิสรานุวงศ์ กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-9742

โทรสาร 02-252-0737

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา, อักษรย่อ	สาขาวิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2533	ปริญญาตรี, สท.บ	สัตวแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2540	Master of Sciences, M.Sc	Veterinary Medicine	University of Minnesota	USA
2543	Doctor of Philosophy, Ph.D.	Physiology	University of Minnesota	USA

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

การขนส่งไอออนผ่านเซลล์เยื่อ ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

โครงการวิจัย	ปีงบประมาณ	ประเภททุน	วงเงินงบประมาณ	เลขที่สัญญา
1. บทบาทของสาร Opioid และ Opioid receptors ต่อการเปลี่ยนแปลงระบบป้องกันของทางเดินอาหารที่ควบคุมโดยระบบประสาท	2544 - 46	ทุนนักวิจัยรุ่นใหม่ สกว	480,000	PDF/29/2544
2. การศึกษากลไกของ Dexamethasone ต่อระบบปกป้องกันการเคลื่อนผ่านของเชื้อแบคทีเรีย Salmonella Enteritidis เข้าสู่ลำไส้ส่วน Peyer's patch ของหนูขาว	2544 - 46	ทุนอุดหนุนการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ	100,000	
3. การศึกษากลไกของสารบาราคอลซึ่งสกัดจาก	2544 - 46	ทุนอุดหนุนการ	100,000	

<p>สมุนไพรที่หลักในการลดจำนวนเชื้อ <i>Salmonella Enteritidis</i> ที่เข้าร่างกายในไก่</p>		<p>วิจัย คณะสัตว แพทยศาสตร์ จุฬาฯ</p>		
<p>4. บทบาทของตัวรับโอปิออยด์ชนิดที่ ตอบสนองต่อความเครียดในการเปลี่ยนแปลง ระบบป้องกันของทางเดินอาหารที่ควบคุมโดย กลไกผ่านระบบประสาทชนิดตัวรับความรู้สึก เบื้องต้น</p>	2547 - 50	<p>ทุนเมธีวิจัย สกว</p>	1,200,000	RSA4780010
<p>5. การศึกษาเปรียบเทียบผลของความเครียด ระยะสั้น และระยะเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลง ระบบภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะเจาะจงของเยื่อ บุทางเดินอากาศ</p>	2547 - 50	<p>ทุนรัชดาภิเษก สมโภช จุฬาฯ</p>	180,000	
<p>6. บทบาทของตัวรับโอปิออยด์ต่อพฤติกรรม การกินหวานในหนูขาวที่ได้รับความเครียดเป็น เวลานาน</p>	2551 - 52	<p>ทุน 90 ปี จุฬาฯ</p>	104,000	
<p>7. บทบาทของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อการ เปลี่ยนแปลงระบบประสาทรับความรู้สึกใน กระดูของหนูเพศเมียที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรค กระดูกพรุน</p>	2551 - 53	<p>ทุนบัณฑิต วิทยาลัย จุฬาฯ และทุนเมธีวิจัย อาวุโส (ศ.ดร. นทีทิพย์ กฤษณามระ</p>	120,000	<p>หัวหน้า โครงการวิจัย</p>
<p>8. ผลของเจนิสทีซิน และโดอะดีซินฮอร์โมนต่อการ เปลี่ยนแปลงระบบประสาทซิมสแตนดท์ที่ และแคลซิโทนินยีนรีเลทเปปไทด์ในปมประสาท ไซลันหลังของหนูเพศผู้</p>	2553-54	<p>ทุนบัณฑิต วิทยาลัย จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย</p>	100,000	<p>หัวหน้า โครงการวิจัย</p>

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

- 7.3.1 Brown DR, Poonyachoti S, Kowalski TR, Okinski MA, Pampusch MS, Elde RP, Murtaugh MP. *delta*-Opioid receptor mRNA expression and immunohistochemical localization in porcine ileum. *Digestive Disease and Sciences* 1997;43:1402-10.
- 7.3.2 Poonyachoti S, Brown DR. Potentiation of anaphylaxis in guinea pig ileal mucosa by a selective delta-opioid agonist. *European Journal of Pharmacology* 1998;379:81-5.
- 7.3.3 Poonyachoti S, Portoghese PS, Brown DR. Characterization of opioid receptors modulating neurogenic contractions of circular muscle from

- porcine ileum and evidence that *delta*- and *kappa*-opioid receptors are coexpressed in myenteric neurons. *Journal of Pharmacological Experiments and Therapeutics* 2001;20: 672-9.
- 7.3.4 **Poonyachoti S, Portoghese PS, Brown DR.** Pharmacological evidence for 7-bezylidenenaltrexone-preferring opioid receptor mediating the inhibitory actions of peptidic *delta*- and *mu*-opioid agonists on neurogenic ion transport in porcine ileal mucosa. *Journal of Pharmacological Experiments and Therapeutics* 2001;297:672-9.
- 7.3.5 **Poonyachoti S, Kulkarni-Narla A, Brown DR.** Chemical coding of neurons expressing *delta*- and *kappa*-opioid receptor and type I vanilloid receptor immunoreactivities in the porcine ileum. *Cells and Tissues Research* 2002;307: 23-33.
- 7.3.6 **Deachapunya C, Thongsaard W, Poonyachoti S.** Barakol suppresses norepinephrine-induced inhibition of spontaneous longitudinal smooth muscle contractions in isolated rat small intestine. *Journal of Ethnopharmacology* 2005;101(1-3):227-32.
- 7.3.7 **Deachapunya C, Poonyachoti S, Thongsaard W, Krishnamra N.** Barakol extracted from *Cassia siamea* stimulates chloride secretion. *Journal of Pharmacology, Experimental and Therapeutics* 2005;314(2):732-7.
- 7.3.8 **Pandaranandaka J, Poonyachoti S, Kalandakanond-Thongsong S.** Anxiolytic property of estrogen related to the changes of the monoamine levels in various brain regions of ovariectomized rats. *Physiology, Behavior and Brain Research* 2006;87:828-35.
- 7.3.9 **Deachapunya C, Poonyachoti S, Krishnamra N.** Regulation of electrolyte transport across cultured endometrial epithelial cells by prolactin. *Journal of Endocrinology* 2008;197:575-82. (impact factor 3.0)
- 7.3.10 **Poonyachoti S, Kalandakanond-Thongsong S, Tuanudom R, Deachapunya C.** Effects of *Pueraria mirifica*, phytoestrogens and 17 β -estradiol on growth and expression of ER α in primary culture of porcine endometrial epithelial cells. Proceedings of the International Workshop on Medicinal and Aromatic Plants. *Acta Horticulturae* 2008;178:67-72.
- 7.3.11 **Pandaranandaka J, Poonyachoti S, Kalandakanond-Thongsong S.** Differential effects of exogenous and endogenous estrogen on anxiety as measured by elevated T-maze in relation to the serotonergic system. *Behavior and Brain Research* 2009;198:142-8.

7.3.12 Deachapunya C, Poonyachoti S, Krishnamara N. Site-specific regulation of ion transport by prolactin in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012., 15;302(1):G1199-206.

7.3.13

7.4 งานวิจัยที่อยู่ในระหว่างดำเนินการ

7.4.1ฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนจากถั่วเหลืองในการเพิ่มระบบตัวรับซีซีเอโรคและการป้องกันการหลวมตัวของเซลล์เยื่อบุเพาะเลี้ยงมดลูกสุกรในภาวะปกติ หรือที่ได้รับสารพิษจากแบคทีเรีย (หัวหน้าโครงการวิจัย) ทุนงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระยะเวลา 1 ปี (1 มีนาคม 2555 – 28 กุมภาพันธ์ 2556) ทำการวิจัยแล้วเสร็จประมาณ 75%

7.4.2 ผลของสารเจนิสทีอินและไดอะซินต่อการหลังไฮโดคายนตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเชื้อโรคในเซลล์เยื่อบุมดลูกสุกร(หัวหน้าโครงการวิจัย) ทุนงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระยะเวลา 1 ปี (1 ตุลาคม 2555 – 30 กันยายน 2556) ทำการวิจัยแล้วเสร็จประมาณ 50%

2. ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ นางสาวฉัตรศรี เดชะปัญญา

Miss Chatsri Deachapunya

2. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3 1005 00345 11 6

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ถนนสุขุมวิท 23 คลองเตยเหนือ กรุงเทพฯ ๑ 10110

โทรศัพท์ 02-649-5374, 260-2233-4 ต่อ 4701

โทรสาร - 02-260-1533

E-mail chatsri@swu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา, อักษรย่อ	สาขาวิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2526	ปริญญาตรี, วท.บ (เกียรตินิยมอันดับ 1)	พยาบาล	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2530	ปริญญาโท, วท.ม	สรีรวิทยา	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2541	Doctor of Philosophy, Ph.D.	Animal Physiology	University of Minnesota	USA

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)
การขนส่งไอออนผ่านเซลล์เยื่อบุ ระบบทางเดินอาหาร

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

โครงการวิจัย	ปีงบประมาณ	ประเภททุน	วงเงิน งบประมาณ	เลขที่สัญญา
1. ฤทธิ์ของสารสกัดบาราคอลในการลด ความเครียดในหนู	2543	งบรายได้ มศว	90,000	14/2543 (หัวหน้า โครงการ)
2. การศึกษาบทบาทของแคลเซียมต่อการ ขนส่งไอออนในเซลล์เยื่อมดลูก	2543 - 45	ทุนวิจัยหลัง ปริญญาเอก สกว	400,000	PDF/60/2543 (หัวหน้า โครงการ)
3. การศึกษาผลของสารสกัดบาราคอลต่อ การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่ถูกระตุ้น ด้วยไฟฟ้าในลำไส้เล็กส่วนอิลีอัมของหนู	2544	งบรายได้ มศว	169,000	44/2544 (หัวหน้า โครงการ)
4. ผลของกวางเครือขาวต่ออัตราการเจริญ ของเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งของมดลูก (Ishikawa cells)	2544	งบประมาณ แผ่นดิน	200,000	109/2544 (หัวหน้า โครงการ)
5. ฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัด จากขี้เหล็กในการแก้ไขและป้องกันความ ผิดปกติของทางเดินอาหาร	2546 - 48	ทุนพัฒนา ศักยภาพใน การทำงาน วิจัยของ อาจารย์รุ่น ใหม่ สกว	420,000	MRG4680196 (หัวหน้า โครงการ)
6. การใช้เซลล์เยื่อมดลูกเพาะเลี้ยงชนิด ไม่ตายเป็นแบบการศึกษาคุณสมบัติของ สารที่มีการออกฤทธิ์เหมือนฮอร์โมนเอสโตร เจน	2548 - 49	งบประมาณ แผ่นดิน	300,000 200,000	023/2548 031/2549 (หัวหน้า โครงการ)
7. บทบาทของสารไฟโตเอสโตรเจนในการ เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการขับหลังของเยื่อ มดลูกที่เกิดจากภาวะฮอร์โมนเพศ บกพร่อง	2550	งบประมาณ แผ่นดิน	400,000	001/2550 (หัวหน้า โครงการ)
8. บทบาทของเอสโตรเจนและสารไฟโต เอสโตรเจนในการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ การขนส่งสารน้ำและอิเล็กโทรไลต์และ ระบบป้องกันเยื่อเมือกของเซลล์เยื่อ	2549 - 52	ทุนพัฒนา ศักยภาพใน การทำงาน วิจัยของ	1,200,000	RMU4980026 (หัวหน้า โครงการ)

มดลูก		อาจารย์รุ่น กลาง สกว		
9. บทบาทของสารไฟโตเอสโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงระบบฟอสและฟอสไลแกนของการตายแบบอพอโตซิสในเซลล์เยื่อบุมดลูกปกติ	2551	งบประมาณแผ่นดิน	547,000	020/2551 (หัวหน้าโครงการ)
10. การศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดบาราคอลต่อการเปลี่ยนแปลงการจับหลังของ secretory immunoglobulin A (sIgA) ในการป้องกันและการเคลื่อนผ่านของเชื้อแบคทีเรีย Salmonella Enteritidis	2551	งบรายได้มศว	285,000	035/2551 (หัวหน้าโครงการ)
11. ฤทธิ์ยับยั้งและกลไกการออกฤทธิ์ของโปรแลคตินในการควบคุมการขนส่งอิเล็กโทรไลต์ในลำไส้ใหญ่ของหนู	2552-53	เงินรายได้มหาวิทยาลัย (เงินรายได้ศูนย์การแพทย์ฯ)	300,000	325/2552 (หัวหน้าโครงการ)
12. ฤทธิ์ยับยั้งของสารไฟโตเอสโตรเจนในการควบคุมการขนส่งอิเล็กโทรไลต์ในเซลล์เยื่อบุมดลูกเพาะเลี้ยงชนิดไม่ตาย	2552-53	งบรายได้มศว	250,000	374/2552 (หัวหน้าโครงการ)
13. ฤทธิ์ยับยั้งและกลไกการออกฤทธิ์ของโปรแลคตินในการควบคุมการขนส่งอิเล็กโทรไลต์ในลำไส้ใหญ่ของหนู	2553-54	เงินรายได้มหาวิทยาลัย (เงินรายได้ศูนย์การแพทย์ฯ)	300,000	278/2553 (หัวหน้าโครงการ)

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

- 7.3.1 Krishnamara N, Deachapunya C, Limlomwongse L. Biliary calcium and bile acid secretion in intact and TPTX rats with varying plasma calcium concentration. *Digestive Disease and Science* 1988;33(6):685-691.
- 7.3.2 Wettanasirichaigoon S, Pongsakorn S, Deachapunya C, Wetchasit P. Comparative study on absorptive ability between simple and strangulated intestinal obstruction: an experimental study. *Thai Journal of Surgery* 1992;13(4):1-6.
- 7.3.3 Pongsakorn S, Deachapunya C, Wetchasit P. The role of royal jelly on blood glucose regulation of alloxan-induced diabetic rats. *Royal Thai Army Medical Journal* 1993;46(2):77-80.

- 7.3.4 Deachapunya C, Thongsaard W, Bennett GW, Marsden CA. The behavioural study of *Cassia siamiae*. *Srinakharinwirot R&D Journal* 1993;7:38-9.
- 7.3.5 Thongsaard W, Deachapunya C, Pongsakom S, Boyd EA, Bennett GW, Marsden CA. Barakol: a potential anxiolytic extracted from *Cassia siamiae*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1996;53(3):753-758.
- 7.3.6 Vetter AE, Deachapunya C, O'Grady SM. Na⁺ absorption across endometrial epithelial cells is stimulated by cAMP-dependent activation of an inwardly rectifying K⁺ channel. *Journal of Membrane Biology* 1997;160:119-26.
- 7.3.7 Deachapunya C, O'Grady SM. Regulation of chloride secretion across porcine endometrial epithelial cells by prostaglandin E₂. *Journal of Physiology* 1998;508:31-47.
- 7.3.8 Deachapunya C, Palmer-Densmore M, O'Grady SM. Insulin stimulates transepithelial sodium transport by activation of a protein phosphatase that increases Na-K ATPase activity in endometrial epithelial cells. *Journal of General Physiology* 1999;114:561-74.
- 7.3.9 Deachapunya C, O'Grady SM. Epidermal growth factor regulates the transition from basal sodium absorption to anion secretion in cultured endometrial epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 2001;186:243-50.
- 7.3.10 Palmer-Densmore M, Deachapunya C, O'Grady SM. UTP-dependent inhibition of Na absorption requires activation of PKC in endometrial epithelial cells. *Journal of General Physiology* 2002;120(6):897-906.
- 7.3.11 Deachapunya C, Thongsaard W, Poonyachoti S. Barakol suppresses norepinephrine-induced inhibition of spontaneous longitudinal smooth muscle contractions in isolated rat small intestine. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 101(1-3):227-32.
- 7.3.12 Deachapunya C, Poonyachoti S, Thongsaard W, Krishnamra N. Barakol extracted from *Cassia siamea* stimulates chloride secretion. *Journal of Pharmacology, and Experimental Therapeutics* 2005;314(2):732-7.
- 7.3.13 Deachapunya C, Poonyachoti S, Krishnamra N. Regulation of electrolyte transport across cultured endometrial epithelial cells by prolactin. *Journal of Endocrinology* 2008;197:575-82.
- 7.3.14 Poonyachoti S, Kalandakanond-Thongsong S, Tuanudom R, Deachapunya C. Effects of *Pueraria mififica*, phytoestrogens and 17 β -estradiol on growth and expression of ER α in primary culture of porcine endometrial epithelial cells. Proceedings of the International Workshop on Medicinal and Aromatic Plants. *Acta Horticulturae* 2008;178:67-72.

- 7.3.15 Deachapunya C, Thongsaaard W. Behavioral effects of acute and chronic oral administration of barakol in rats. *Journal of the Medical Association of Thailand* 2009;92(Suppl.3):S29-37.
- 7.3.16 Deachapunya C, Poonyachoti S, Krishnamara N. Site-specific regulation of ion transport by prolactin in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012., 15;302(1):G1199-206.
8. งานวิจัยที่อยู่ในระหว่างดำเนินการ
1. ฤทธิ์ระยะยาวของสารเจนีสเทอินต่อการแสดงออกของยีนและโปรตีนขนส่งไอออนในเซลล์เยื่อบุหลอดเพาะเลี้ยงชนิดไม่ตาย (ทำการวิจัยแล้วเสร็จประมาณ 50%)